

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

JAMILLE CANEVA OLIVEIRA REBELO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
MODELO EXPERIMENTAL DE COCAÍNA SUBAGUDA EM RATOS.

VITÓRIA
2018

JAMILLE CANEVA OLIVEIRA REBELO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
MODELO EXPERIMENTAL DE COCAÍNA SUBAGUDA EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Suely Gomes de Figueiredo

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Livia Carla de Melo Rodrigues

VITÓRIA

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

REGISTRO DE JULGAMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em ____ de ____ de ____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Suely Gomes de Figueiredo (PPGCF-UFES)

Orientadora

Profª Drª Livia Carla de Melo Rodrigues (PPGCF-UFES)

Co-orientadora

Profª. Drª Mayla Ronacher Simões (PPGCF-UFES)

Drª. Fabiana Vasconcellos Campos (PPGB - UFES)

Dedico esse trabalho aos meus pais, irmãos e ao meu marido.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido por ser meu grande incentivador. Obrigada por tornar o caminho mais sereno.

Aos meus pais, **Maria Elisete Caneva de Oliveira** e **Jorge Luiz de Oliveira**, por todo incentivo e dedicação ao longo desses 30 anos. Amo vocês.

A professora **Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo**, minha orientadora, por ter me acolhido no Laboratório de Química de Proteínas. Obrigada por compartilhar comigo seus grandiosos conhecimentos científicos. Você é um exemplo de profissional dedicada e apaixonada pela pesquisa. Obrigada por ter acreditado na minha capacidade para finalizar esse projeto.

A professora **Dr^a. Livia Carla de Melo Rodrigues**, minha co-orientadora, por ter cedido todo aparato do Laboratório de Neurotoxicologia e Psicofarmacologia para a realização desse projeto. Obrigada pelos conselhos e palavras amiga nos momentos de aflição.

A **Lidiane Barcelos**, aluna de iniciação científica, obrigada por ter me ajudado na árdua tarefa dos longos dias de tratamento e testes comportamentais. Obrigada por ter sido companheira e compreensiva nos momentos de estresse.

Meu muito obrigada, aos alunos dos laboratórios LANEP, LCCNPF e LQP que contribuíram direta e indiretamente para concretização desse projeto: **Juliana Pedrosa, Matheus Loureiro, Igor Ferraz, Gustavo Naumann, Thiago Menezes, Elisa Fraga e Ingryd Fortes**. Agradeço também aos alunos do Laboratório de Imunologia por terem auxiliado no uso do leitor de placas necessário para a realização dos ensaios bioquímicos.

Ao professor Dr^o. **Marcelo Eustáquio Silva** e a professora **Dr^a. Maria Lucia Pedrosa** por terem me acolhido na Universidade Federal de Ouro Preto-MG. Obrigada por contribuírem para o desenvolvimento desse trabalho. Meu muito obrigada as Doutorandas **Mayara Medeiros de Freitas Carvalho** e **Alice Helena de Souza Paulino**, pela recepção calorosa em Ouro Preto e por terem se dedicado inteiramente para a realização dos ensaios de Glutathione. Desejo muito sucesso na carreira científica de vocês.

Obrigada a banca examinadora, professora **Dr^a. Mayla Ronacher Simões** e **Dr^a. Fabiana Vasconcelos Campos**, por terem contribuído com valiosos apontamentos para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, por compartilharem os desafios das jornadas acadêmicas. Agradeço a todos, pelos incentivos e palavras amigas nos momentos que mais precisei.

Meu muito obrigada aos técnicos de laboratório, **Josué** (LCCNPF) e **Soninha** (Laboratório de aulas práticas de Bioquímica), por todos os auxílios prestados ao longo desses dois anos.

Aos animais de laboratório, fundamentais para realização desse trabalho, meu agradecimento e respeito.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse projeto!

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 DROGAS DE ABUSO.....	13
1.2 COCAÍNA.....	14
1.3 TOXICOLOGIA DA COCAÍNA.....	16
1.4 CIRCUITO DE RECOMPENSA.....	19
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS.....	22
1.6 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	23
1.6.1 SISTEMA DE DEFESA ENZIMÁTICO.....	23
1.6.2 SISTEMA DE DEFESA NÃO ENZIMÁTICO.....	24
1.7 N-ACETILCISTEÍNA.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 REAGENTES.....	28
3.2 ANIMAIS.....	28
3.3 DOSAGEM DA COCAÍNA NA DROGA BRUTA.....	29
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.5 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (TRO).....	31
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	32
3.7 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE....	33
3.7.1 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA E RAZÃO GSH/GSSG.....	33
3.7.2 ESTRESSE OXIDATIVO PROTEICO.....	34
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 PERCENTUAL DE COCAÍNA NA DROGA BRUTA E ADULTERANTES ...	37
4.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	39
4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	40
4.3.1 CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA E RAZÃO GSH/GSSG.....	41

4.3.2	ESTRESSE OXIDATIVO PROTEICO.....	43
5.	DISCUSSÃO	47
6.	CONCLUSÃO	55
7.	REFERÊNCIAS	56

RESUMO

O consumo de drogas de abuso é considerado um sério problema sócio-econômico de abrangência global. Dentre essas drogas destaca-se a cocaína, visto que pesquisas recentes têm apontado um aumento no consumo, principalmente, devido ao aumento de usuários na América do Sul. O consumo dessa droga tem sido associado a danos cognitivos, dentre esses o prejuízo na memória. Estudos tem buscado tratamentos medicamentosos afim de reduzir/prevenir os danos sobre a memória, dentre esses medicamentos tem-se a N-acetilcisteína (NAC). Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo investigar os possíveis efeitos do pré-tratamento com NAC seguido do consumo de cocaína, sobre a memória de reconhecimento e estresse oxidativo proteico cerebral. Para tanto, ratos Wistar machos foram submetidos ao protocolo do teste de reconhecimento de objetos (TRO) para avaliação da memória de curto prazo 1h 30 min após a seção treino e memória de longo prazo 24h após a seção treino. Ao final do protocolo comportamental os animais foram eutanasiados e as regiões cerebrais do córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HPC) foram coletados para análise bioquímicas, como: concentração de glutathione reduzida (GSH), razão glutathione reduzida e glutathione oxidada (GSH/GSSG), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e índice de carbonilação proteica por densitometria (Oxyblot). Nossos resultados mostraram que os animais que receberam cocaína (10mg/Kg) apresentaram um prejuízo na memória de curto prazo quando comparados aos animais controle ($p=0,005$). Os animais que receberam cocaína, porém foram previamente tratados com NAC apresentaram melhora na memória de longo prazo quando comparados com os animais que não foram previamente tratados com NAC ($p=0,001$). O grupo submetido ao pré-tratamento com NAC seguido do tratamento com cocaína não apresentou diferença significativa no dano oxidativo proteico no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HPC), quando comparados com o grupo previamente tratado com salina. As principais conclusões do presente trabalho apontam a NAC foi capaz de proteger a memória de reconhecimento.

Palavras-chave: memória de reconhecimento, cocaína, N-acetilcisteína, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The use of drugs of abuse is considered a serious social-economic problem around the world. Among these drugs, cocaine stands out since recent researches have pointed out an increase in consumption, mainly due to the increase of users in South America. Consumption of this kind of drug has been associated with cognitive impairment. Because of this, studies have sought medicaments in order to reduce /prevent damage to memory, presenting N-acetylcysteine (NAC) as one of them. So, the present work had the objective of investigating the possible effects of pre-treatment with NAC followed by cocaine consumption, on memory and oxidative stress brain protein. Therefore, male Wistar rats were submitted to the object recognition test (ORT) protocol for short-term memory evaluation 1h 30 min after the training session and long-term memory 24h after the training session. At the end of the behavioral protocol the animals were euthanized and the cerebral regions of the prefrontal cortex (CPF) and hippocampus (HPC) were collected for biochemical analysis, such as: reduced glutathione (GSH), reduced glutathione ratio and oxidized glutathione / GSSG), advanced protein oxidation products (AOPP) and protein carbonylation index by densitometry (Oxyblot). Results showed that animals receiving cocaine (10mg / kg) presented short term memory impairment when compared to control animals ($p = 0.005$). On other hand, animals that received cocaine but were previously treated with NAC showed improvement in long-term memory when compared to animals that were not previously treated with NAC ($p = 0.001$). The group submitted to pre-treatment with NAC followed by cocaine treatment did not present a significant difference in protein oxidative damage in the prefrontal cortex (CPF) and hippocampus (HPC) when compared to the group previously treated with saline. The main conclusions of the present work point out NAC was able to protect memory recognition.

Keywords: recognition memory, cocaine, N-acetylcysteine, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da cocaína.....	14
Figura 2. Modelo esquemático de toxicocinética em dois compartimentos (PAN et al, 1991). Fração da cocaína injetada disponibilizada ao sistema circulatório a partir da cavidade corporal (f); constante de absorção de cocaína para corrente sanguínea (k_a); volume de distribuição (v_1 e v_2); constante de penetração de cocaína através da barreira hemato-encefálica (k_{12} e k_{21}); e constante de eliminação (k_{el}) (adaptado de PAN et al, 1991).....	17
Figura 3. Esquema simplificado do circuito de recompensa do cérebro humano. O cérebro à esquerda representa aferências dopaminérgicas que se originam na área tegmental ventral (ATV) e liberam dopamina no núcleo accumbens (NAc) e muitos outros alvos límbicos. Também são mostrados outros núcleos monoaminérgicos - o locus coeruleus noradrenérgico (LC) e a rafe dorsal serotoninérgica (DR) - que modulam a recompensa da droga e outras ações. O cérebro à direita destaca as regiões glutamatérgicas que são importantes para a recompensa: córtex pré-frontal medial (CPFm), córtex orbitofrontal (COF), córtex cingulado anterior (CCA), tálamo (Tal), hipocampo e amígdala, todos os quais enviam projeções excitatórias para o NAc (ROBISON e NESTLER, 2011).....	19
Figura 4. Esquema simplificado do circuito de recompensa em cérebro de rato. Área tegmental ventral (ATV), núcleo accumbens (NAc) Córtex pré-frontal medial (CPFm), hipocampo (Hip), Estriado (Est), amígdala (Ami), lateral dorsal tegmental (LDTg), lateral habenula (LHb), hipotálamo lateral (HL). (RUSSO e NESTLER, 2013).....	20
Figura 5. Diagrama da relação entre enzimas antioxidantes, GSH e GSSG. SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPX, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione reduzida; GSSG, glutathione oxidada (BOROWICZ et al, 2016).....	24
Figura 6. Estrutura molecular da N-acetilcisteína. Fonte: Farmacopéia brasileira 5ª edição)	25
Figura 7. Esquema simplificado da síntese de GSH (HEARD, 2008).	26
Figura 8. Representação esquemática do desenho experimental. Memória de curta duração (STM). Memória de longa duração (LTM).	31
Figura 9. Esquema das etapas do teste de reconhecimento de objetos. A) Treino: A1 são objetos idênticos; (B) MCP: A1 (objeto familiar) e B1 (objeto novo); (C) MCP: A1 (objeto familiar) e C1 (objeto novo).	32
Figura 10. Representação esquemática das etapas do Oxyblot (STANKOWSKI et al., 2011).	36
Figura 11. Cromatograma da droga bruta (A). Identificação dos componentes da amostra por fragmentação por impacto eletrônico; lidocaína (B); cafeína (C); cocaína (D).	38
Figura 12. Índice de reconhecimento de objeto familiar na memória de curta duração (STM). ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. ANOVA 2 vias post-hoc Bonferroni (n=8-9). Dados representados média \pm EPM.....	39
Figura 13. Índice de reconhecimento de objeto familiar na memória de longa duração (LTM). ** $p = 0,001$ e * $p < 0,05$. ANOVA 2 vias post-hoc Bonferroni (n=8-9). Dados representados média \pm EPM.....	40

Figura 14 Dosagem de Glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal. Kruskal-Wallis test (n= 5-10). Dados representados média \pm EPM.41

Figura 15 Dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) no hipocampo. Kruskal-Wallis test (n= 5-7). Dados representados média \pm EPM.41

Figura 16 Razão entre GSH/GSSG no córtex pré-frontal. Kruskal-Wallis test (n= 5-10). Dados representados média \pm EPM.42

Figura 17 Razão entre GSH/GSSG no hipocampo. Kruskal-Wallis test(n=5-6). Dados representados média \pm EPM.42

Figura 18 Proteínas carboniladas no córtex pré-frontal. Kruskal-Wallis test (n= 5-6). Dados representados média \pm EPM. Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP).43

Figura 19 Proteínas carboniladas no hipocampo. Kruskal-Wallis test (n= 5-6). Dados representados média \pm EPM. Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP).44

Figura 20. Análise da carbonilação de proteína do córtex pré-frontal por Oxyblot. (A) Western blotting com replicata biológica de cada grupo experimental (1-Controle, 2-NAC-Salina, 3-Salina Coc-10, 4-NAC Coc-10). (B) Gráfico de densitometria com replicata biológica de cada grupo experimental (1-Controle, 2-NAC-Salina, 3-Salina Coc-10, 4-NAC Coc-10). (C) Análise gráfica da densidade relativa da carbonilação de proteína da média de cinco replicatas biológicas de cada grupo experimental. * $p < 0,05$. ANOVA 1 via com Dunn's Multiple Comparison Test (n=5). Dados representados média \pm EPM. Para a avaliação do índice de carbonilação de proteínas nos grupos estudados, a densidade do grupo controle foi considerada 100% em cada blot. A efetividade do método foi comprovada pelo não aparecimento de banda nas amostras não derivatizadas (#).....45

Figura 21. Análise da carbonilação de proteína do hipocampo por Oxyblot. (A) Western blotting com replicata biológica de cada grupo experimental (1-Controle, 2-NAC-Salina, 3-Salina Coc-10, 4-NAC Coc-10). (B) Gráfico de densitometria com replicata biológica de cada grupo experimental (1-Controle, 2-NAC-Salina, 3-Salina Coc-10, 4-NAC Coc-10). (C) Análise gráfica da densidade relativa da carbonilação de proteína da média de cinco replicatas biológicas de cada grupo experimental. * $p < 0,05$. ANOVA 1 via com Dunn's Multiple Comparison Test (n=5). Dados representados média \pm EPM. Para a avaliação do índice de carbonilação de proteínas nos grupos estudados, a desidade do grupo controle foi considerada 100% em cada blot. A efetividade do método foi comprovada pelo não aparecimento de banda nas amostras não derivatizadas (#).....46

Figura 22. Representação esquemática simplificada dos mecanismos de ação da cocaína e da N-acetilcisteína sobre o circuito de memória do córtex pré-frontal. (A) Possível mecanismo responsável pelo prejuízo à memória relacionado ao consumo de cocaína. (B) Possível mecanismo desencadeado pelo pré-tratamento com NAC seguido do tratamento com cocaína. Extraído e modificado de (GOLDMAN-RAKIC et al., 2000; DEAN et al.,2011) xCT: antitransportador cistina/glutamato; receptor D1 em vermelho; NAC: N-acetilcisteína; L-Cys: Cisteína; L-Glu: Glutamato.54

LISTA DE ABREVIATURAS

ATV	Área tegmental ventral
AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica
CG	Cromatógrafo gasoso
COC	Cocaína
CPF	Córtex pré-frontal
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
DA	Dopamina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EM	Espectrômetro de massa
EST	Estriado
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HPC	Hipocampo
STM	Memória de curta duração
LTM	Memória de longa duração
NA	Noradrenalina
NAC	N-acetilcisteína
NAc	Núcleo accumbens
SE	Sertralina
SNC	Sistema nervoso central
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TRO	Teste de reconhecimento de objetos

1. INTRODUÇÃO

1.1 DROGAS DE ABUSO

O uso de drogas de abuso está relacionado a uma série de problemas sociais, como: violência, acidentes de trânsito, transmissão de doenças, crimes sexuais, entre outros, sendo considerado um sério problema sócio-econômico de abrangência global. Diante disso, a Organização Mundial de Saúde define o abuso como o uso nocivo ou perigoso de substâncias psicoativas (UNODC,2018).

As substâncias psicoativas são definidas como qualquer substância capaz de alterar a percepção, o comportamento, a função motora ou cognitiva. Tem-se como substâncias psicoativas: os medicamentos sujeitos a controle especial (antidepressivos, ansiolíticos, sedativos e analgésicos), as drogas ilícitas e as substâncias não sujeitas a controle legal, como: cafeína, nicotina e álcool (para revisão ver BACONI et al., 2015).

As drogas ilícitas são definidas como substâncias que não possuem uso permitido em determinado território. Conforme a Portaria nº 344/98 emitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as drogas ilícitas são substâncias denominadas de uso proscrito constantes na Lista F, entre as quais tem-se o êxtase, a heroína e a cocaína, bem como as constantes da Lista E. Esta última refere-se às plantas das quais são extraídas as substâncias elencadas na Lista F.

Não obstante as implicações da norma penal a respeito do uso de substância proibida, tem-se verificado um aumento no número de usuários e atrelado a isso um aumento dos gastos públicos para a prevenção e tratamento. Com base nesse panorama, o último relatório da Organização das Nações Unidas revelou que cerca de 275 milhões de pessoas com idade entre 15 e 64 anos, 5,6% da população mundial, consumiram pelo menos um tipo de droga ilícita em 2016. Dentre essas, destaque para o aumento no consumo de cocaína, que tem ocorrido, principalmente, devido ao aumento de usuários na América do Sul (UNODC, 2018).

Dentro desse contexto, o último levantamento realizado no Brasil revelou que 3,8%

da população adulta fez uso de cocaína pelo menos uma vez na vida, representando cerca de 5 milhões de brasileiros (LARANJEIRA et al., 2012).

1.2 COCAÍNA

A cocaína, benzoilmetilecgonina, é um alcaloide tropânico (Figura 1) com propriedades psicoestimulantes obtido a partir da extração das folhas da planta da espécie *Erythroxylum coca*, popularmente conhecida como folha de coca.

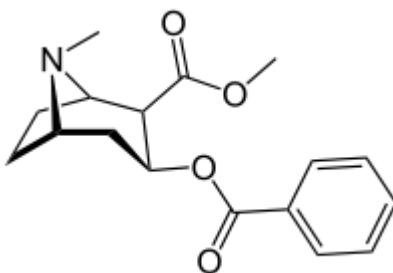


Figura 1. Estrutura molecular da cocaína. Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Coca%C3%ADna>

Para a obtenção dos produtos a folha de coca passa por um processo complexo de extração ácido-básica com solventes orgânicos. O primeiro produto obtido é a pasta base de cocaína, que ao ser cristalizada em meio ácido permite a obtenção da forma de sal denominada cloridrato de cocaína, que é um pó branco, solúvel em água e comumente administrado por via nasal ou intravenosa. Da mesma forma, a pasta base também pode passar por um processo de alcalinização com formação dos subprodutos fumados, como o crack e a merla (HAWKS, 1977; GRABOWSKI e DWORKIN, 1985; DUAILIBI et al., 2008).

O primeiro registro do consumo de cocaína - datado do século VI d.C. - foi verificado nas populações andinas. Para os Incas a folha de cocaína tinha significado religioso, pois era entregue como uma oferenda aos deuses para a passagem segura através dos Andes (PETERSEN, 1977a). No entanto, o uso popular mais conhecido da folha de cocaína é pela população Boliviana e Peruana, na forma de chá ou pela mastigação

da folha, e, assim, utilizada como estimulante, supressor de apetite e com objetivo de aumentar a resistência em altas altitudes. (CARROL, 1977).

O isolamento da cocaína foi realizado pela primeira vez em 1880 e teve como principal finalidade o uso como anestésico local em cirurgias oftálmicas, mas também em cirurgias de nariz e garganta, devido às suas propriedades vasoconstrictoras (para revisão ver PETERSEN, 1977b; FLEMING et al, 1990). Porém, o uso medicinal foi acompanhado pelo aparecimento de quadros de intoxicação que ocasionaram óbitos devido a complicações cardiovasculares. Com o aumento nos casos de intoxicações fatais o uso medicinal foi extinto, e em 1920 a cocaína foi incluída na lista de substâncias proscritas nos EUA. A primeira punição para venda de cocaína no Brasil surgiu com a Lei nº. 4.294 de 14 de julho de 1921. Importante destacar que, apesar das proibições o uso recreativo permaneceu (RUETSCH et al., 2001; TORCATO, 2013).

O uso recreativo da cocaína ganhou destaque na década de 1970 e foi acompanhado pelo aumento da dose e consequentemente pelo aumento dos casos de intoxicação (SIEGEL, 1977; SIEGEL, 1982; CREGLER e MARK, 1986). Na intoxicação por cocaína os indivíduos podem apresentar sinais periféricos relacionados ao aumento do estímulo sobre o Sistema Nervoso Autônomo Simpático: taquicardia, diaforese e midríase; e efeitos centrais relacionados à estimulação do sistema nervoso central: estado de alerta aumentado, redução de apetite, hipercinesia (motilidade excessiva) e hipertermia. Além dessa sintomatologia os indivíduos também podem apresentar alucinações e paranoias (DACKIS e GOLD, 1985; VASICA e TENNANT, 2002; HAASEN et al., 2005; SCHWARTZ et al., 2010).

Além dos sinais decorrentes do uso da cocaína, diversos autores descreveram os sintomas apresentados pelos usuários de cocaína. Sintomas positivos incluem a euforia, aumento da energia, experiência sensorial e autoconfiança. Passados os efeitos prazerosos, os indivíduos podem apresentar sintomas negativos, que são: a irritabilidade, ansiedade, agitação e disforia. Esses podem ser revertidos por outra administração da droga (DACKIS e GOLD, 1985; GAWIN, 1991; KOOB e VOLKOW, 2010). Com isso, os usuários de cocaína podem apresentar comportamentos que vão desde sensações de euforia à disforia.

1.3 TOXICOLOGIA DA COCAÍNA

A duração e a intensidade dos efeitos da cocaína decorrem da dose e da via de administração. Com o intuito de simular os efeitos da cocaína em humanos, pesquisadores realizam ensaios pré-clínicos em animais. Esses ensaios têm como objetivo administrar doses de cocaína em concentrações equivalentes às usadas em humanos -0,3 - 1,2 mg/Kg por via intravenosa (i.v.). Para isso, as doses de cocaína comumente utilizadas nos ensaios animais são de 1 -18 mg/Kg (i.v.) e 5 - 40 mg/Kg por via intraperitoneal (i.p.). As doses são ajustadas considerando as diferenças nas taxas metabólicas e peso corpóreo (KANTAK et al, 2005; BORTOLOTTI et al, 2012; POMIERNY-CHAMIOLO et al., 2013).

Nos ensaios pré-clínicos a via de administração mais utilizada é a i.p., uma vez que a cavidade abdominal é altamente vascularizada e permite rápida absorção de drogas, além de demandar aparelhamento menos complexo que a via intravenosa. Em termos comparativos, a velocidade de absorção i.p. corresponde à 25 a 50% quando comparada a via i.v. (WOODART, 1965).

A toxicocinética da administração intraperitoneal envolve: absorção, distribuição e eliminação. E, como outras drogas similares, o aumento da dose administrada de cocaína acarreta em aumento na concentração no SNC. Além desse fator, a dinâmica de administrações repetidas de cocaína i.p. também aumenta significativamente a absorção de cocaína da cavidade abdominal para a circulação sistêmica (PAN, et al, 1991). A figura 2, mostra um esquema da cinética de absorção/distribuição da cocaína, quando injetada por via intraperitoneal.

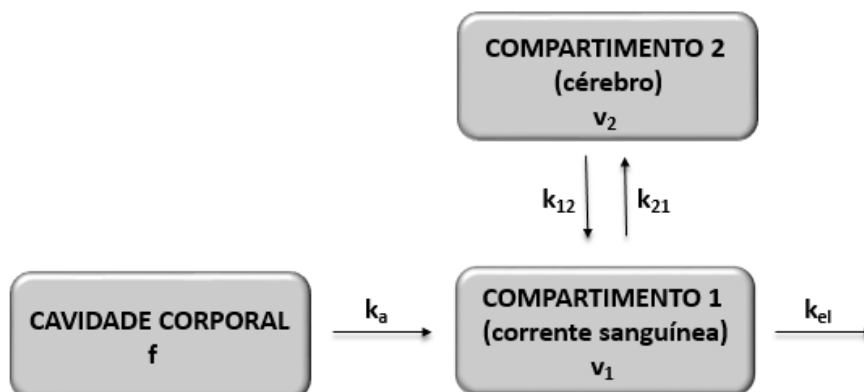


Figura 2. Modelo esquemático de toxicocinética em dois compartimentos (PAN et al, 1991). Fração da cocaína injetada disponibilizada ao sistema circulatório a partir da cavidade corporal (f); constante de absorção de cocaína para corrente sanguínea (k_a); volume de distribuição (v_1 e v_2); constante de penetração de cocaína através da barreira hemato-encefálica (k_{12} e k_{21}); e constante de eliminação (k_{el}) (adaptado de PAN et al, 1991).

Uma vez no sistema nervoso central a cocaína desencadeia uma série de alterações neurofisiológicas ocasionadas por alterações nos sistemas de neurotransmissão central de dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (SER) (DACKIS e GOLD, 1985; GORELICK et al., 2004), visto que atua como um potente bloqueador do transportador responsável pela recaptação desses neurotransmissores (RITZ et al., 1987 ; HYMAN e MALENKA, 2001). O aumento na disponibilidade dos neurotransmissores DA, NA e SE, nas sinapses, permite a manutenção dos efeitos estimulantes decorrentes da administração da droga.

A busca pelos efeitos prazerosos faz com que alguns usuários desenvolvam um quadro de adição, que é conceituado como um transtorno que envolve ciclos de uso da drogas, abstinência e recaída, sendo caracterizado pela busca compulsiva pela droga sem considerar as consequências prejudiciais decorrentes do consumo (DACKIS e GOLD, 1985; WOLF, 2016). Para tanto, a Associação Americana de Psiquiatria classifica o padrão de uso de cocaína - adição - como transtorno por consumo de substâncias conforme o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais [DSM-5] (GORELIK, 2017). Tabela 1.

Tabela 1- DSM 5 - Padrão de uso de cocaína com comprometimento ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por dois ou mais dos seguintes em um período de 12 meses:

Transtornos por uso de cocaína

- A cocaína é frequentemente tomada em quantidades maiores ou durante um período mais longo.
 - Existe um desejo persistente ou esforços infrutíferos para reduzir ou controlar o uso de cocaína
 - Grande tempo é gasto em atividades necessárias para obter cocaína, usar cocaína, ou recuperar de seus efeitos
 - Forte desejo ou desejo de usar cocaína
 - O uso recorrente de cocaína, que resulta em uma falha no cumprimento das principais obrigações no trabalho, na escola ou em casa
 - Continua o consumo de cocaína apesar de ter problemas sociais ou interpessoais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da cocaína
 - Atividades sociais, ocupacionais ou recreativas importantes são dadas ou reduzidas por causa do uso de cocaína
 - Continuação do uso de cocaína apesar do conhecimento de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que provavelmente tenha sido causado ou exacerbado pela cocaína
 - Tolerância
 - Retirada
-

Fonte: GORELICK, 2017

No que tange ao desenvolvimento da adição, estudo realizado por Dileone e colaboradores evidenciou que as drogas de abuso alteram o circuito de recompensa natural, evolutivamente otimizado para a sobrevivência. Este circuito é o sistema responsável pela modulação de respostas a estímulos que ativam sensações de prazer (DILEONE et al., 2012).

Com isso, pesquisas pré-clínicas e clínicas têm estudado as relações entre o consumo de cocaína e as neuroadaptações nas regiões cerebrais que compõem o circuito de recompensa (KOOB e VOLKOW, 2010; WOLF, 2016). Com base nesses estudos, tem-se demonstrado que a chave para o desencadeamento dos estímulos de gratificação ocasionados pela cocaína estão relacionados ao aumento na disponibilidade de dopamina nas sinapses do circuito de recompensa (para revisão ver KOOB e VOLKOW, 2010).

1.4 CIRCUITO DE RECOMPENSA

O circuito de recompensa cerebral, também denominado sistema mesocorticolímbico dopaminérgico, é o sistema responsável pela modulação de respostas a estímulos que ativam sensações de prazer. Esse circuito compreende uma rede complexa de neurônios dopaminérgicos que se projetam da área tegmental ventral (ATV) para o núcleo accumbens (NAc), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e amígdala (Ami). O circuito de recompensa também envolve inervações glutamatérgicas que se projetam de regiões cerebrais como, córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala para o núcleo accumbens, além de inervações glutamatérgicas recíprocas entre o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala. Além dessas projeções o circuito de recompensa conta ainda com inervações GABAérgicas que regulam a neurotransmissão inibitória (WISE e BOZARTH, 1987; KOOB e VOLKOW, 2010; ROBISON e NESTLER, 2011; RUSSO e NESTLER, 2013). Figura 3.

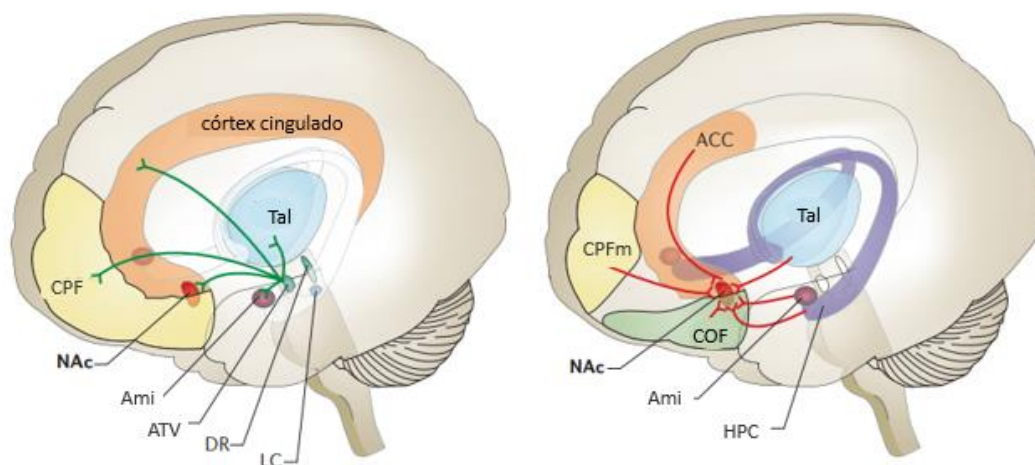


Figura 3. Esquema simplificado do circuito de recompensa do cérebro humano. O cérebro à esquerda representa aferências dopaminérgicas que se originam na área tegmental ventral (ATV) e liberam dopamina no núcleo accumbens (NAc) e muitos outros alvos límbicos. Também são mostrados outros núcleos monoaminérgicos - o locus coeruleus noradrenérgico (LC) e a rafe dorsal serotoninérgica (DR) - que modulam a recompensa da droga e outras ações. O cérebro à direita destaca as regiões glutamatérgicas que são importantes para a recompensa: córtex pré-frontal medial (CPFm), córtex orbitofrontal (COF), córtex cingulado anterior (CCA), tálamo (Tal), hipocampo e amígdala, todos os quais enviam projeções excitatórias para o NAc (ROBISON e NESTLER, 2011).

Diversos estudos relacionados ao circuito de recompensa têm sido realizados em animais de laboratório, considerando que apresentam projeções neurais muito semelhantes às projeções neuronais no homem, como pode ser observado na figura 4. (HABER e KNUTSON, 2010; RUSSO e NESTLER, 2013).

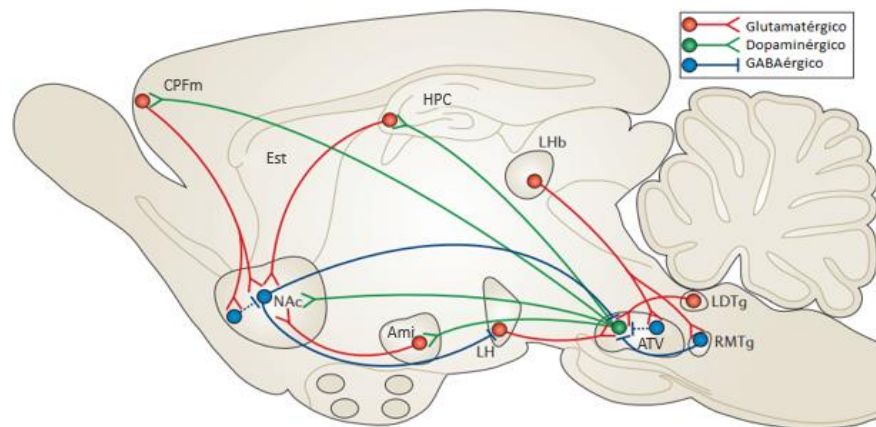


Figura 4. Esquema simplificado do circuito de recompensa em cérebro de rato. Área tegmental ventral (ATV), núcleo accumbens (NAc) Córtex pré-frontal medial (CPFm), hipocampo (Hip), Estriado (Est), amígdala (Ami), lateral dorsal tegmental (LDTg), lateral habenula (LHb), hipotálamo lateral (HL). (RUSSO e NESTLER, 2013).

Cabe ressaltar que esse circuito abrange regiões cerebrais relacionadas a importantes funções cognitivas, como: córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. O córtex pré-frontal desempenha papel importante na memória de trabalho e em atividades que envolvem a atenção (KESNER et al, 1996; FERGUSON e GAO, 2015). O estriado está relacionado à memória, aprendizado e resposta comportamental a estímulos (HYMAN e MALENKA, 2001; GOODMAN; PACKARD, 2016). E o hipocampo está relacionado à memória de reconhecimento, memória de trabalho, navegação espacial e comportamento social (NAKAMURA et al, 1991; ROTHBLAT e KROMER, 1991; RUBIN et al., 2014). Essas áreas são importantes para o desempenho de tarefas de natureza intelectual e social.

Diante disso, diversos estudos comportamentais têm avaliado aspectos relacionados a desordens neurológicas em razão do consumo de drogas de abuso. Dentre essas drogas, o destaque no presente trabalho será dado à cocaína, uma vez que a adição

à cocaína está relacionada ao desencadeamento de prejuízos cognitivos, tais como: depressão, desinibição comportamental, agressividade, déficits de motivação e atenção (MAJEWSKA, 1996).

Considerando o exposto, os testes comportamentais amplamente empregados para avaliar os prejuízos cognitivos ocasionados por drogas que atuam no circuito de recompensa, são: (i) labirinto radial de oito braços - avalia a memória de trabalho e navegação espacial (NAKAMURA et al, 1991; MELO et al, 2005); e (ii) teste de localização (TLO) e o teste de reconhecimento de objetos (TRO), os quais analisam a memória de localização espacial e reconhecimento de objetos, respectivamente (LIMA et al, 2011; para revisão ver WARBURTON e BROWN, 2015).

O TRO é um modelo comportamental baseado na preferência inata dos roedores em explorar um objeto novo em detrimento do objeto familiar. Esse teste permite avaliar processos de aprendizagem e memória por meio da utilização de objetos com diferentes formas, cores, brilhos e texturas (AGGLETON, 1985; ENNACEUR, 2010; VAN GOETHEM et al, 2012). O TRO se destaca como teste comportamental para ensaios com drogas de abuso, visto que não envolve mecanismos de recompensa ou punição. Além de estar relacionado com ativação de regiões cerebrais presentes no circuito de recompensa, como: hipocampo, córtex pré-frontal e tálamo (BARKER et al., 2007; BALDERAS et al, 2014; para revisão ver WARBURTON e BROWN, 2015).

Além da influência da cocaína sobre a memória - avaliada por meio dos testes comportamentais - estudos têm demonstrado que o consumo de cocaína acarreta desordens bioquímicas, principalmente, alterações nos parâmetros de estresse oxidativo no circuito de recompensa. Pesquisa realizada por Pomierny-Chamiolo e colaboradores demonstrou que ratos submetidos ao tratamento com doses repetidas de cocaína - em ensaio de autoadministração - apresentaram alterações em parâmetros de estresse oxidativo, com aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), no córtex frontal, estriado dorsal e hipocampo. Outro estudo revelou que ratos submetidos ao tratamento agudo/crônico apresentaram redução na concentração de glutathiona reduzida (GSH) no núcleo accumbens (UYS et al., 2011; POMIERNY-CHAMIOŁO et al., 2013). Diante do exposto, o estudo do estresse oxidativo no consumo de cocaína pode ser uma das principais fontes para o entendimento do comportamento cognitivo.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS

O estresse oxidativo é um processo no qual ocorre um desequilíbrio entre a formação excessiva de moléculas oxidantes - espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) – e a capacidade de defesa dos mecanismos antioxidante em neutralizá-las. Esse desequilíbrio acarreta em uma série de alterações moleculares, visto que as espécies reativas são capazes de reagir com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Essas interações podem desencadear morte celular decorrente dos processos de carbonilação proteica, peroxidação lipídica e alterações genéticas (para revisão ver SIES, 1986; SALMINEN; PAUL, 2014).

Cabe destacar que o tecido cerebral é muito vulnerável ao estresse oxidativo, pois possui elevado metabolismo oxidativo e limitada capacidade antioxidante (HULBERT et al., 2007). Além disso, como já descrito acima, evidências indicam que o consumo de cocaína tem sido apontado como um fator importante para o desenvolvimento de estresse oxidativo (UYS et al., 2011; POMIERNY-CHAMIOŁO et al., 2013).

As espécies reativas de oxigênio pertencem a duas classes de moléculas derivadas de oxigênio molecular: as radicalares, que são espécies químicas com elétrons desemparelhados, e as não radicalares. As radicalares são: hidroxil ($\text{HO}\cdot$), peroxil ($\text{ROO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peridroxil ($\text{HO}_2^{\cdot-}$), alcóxil ($\text{RO}\cdot$); e não radicalares: oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), hidroperóxido (ROOH), ozônio (O_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (para revisão ver ARUOMA, 1998; TURRENS, 2003).

Cabe destacar que as espécies reativas são naturalmente formadas no organismo por meio da respiração celular. Evidências têm apontado a geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente, nos complexos I e III da cadeia respiratória (para revisão ver TURRENS, 2003; TAHARA et al., 2009). Segundo Barja e Herrero o complexo I é a principal fonte de radical superóxido no tecido cerebral (BARJA e HERRERO, 1998). A formação das espécies reativas de oxigênio na cadeia respiratória ocorre devido a falhas nos processos de redução do oxigênio em água, este é finalizado na citocromo oxidase terminal (Complexo IV). A redução tetravalente do oxigênio acarreta na formação da água, enquanto a redução monovalente resulta na formação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (LOSCHEN et al., 1974; BARJA e HERRERO, 1998).

Vale destacar que além da formação endógena as espécies reativas também podem ser originadas por processos exógenos, como: radiações ionizantes, toxinas, drogas, produtos químicos, agentes poluidores ambientais, entre outros.

Para combater os efeitos danosos das espécies reativas, o organismo possui um sistema intrínseco de defesa composto por antioxidantes enzimáticos, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e não enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH). O equilíbrio entre os mecanismos oxidantes e antioxidantes é de extrema importância para a manutenção da homeostasia corporal (SALMINEN e PAUL, 2014).

1.6 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

1.6.1 SISTEMA DE DEFESA ENZIMÁTICO

O sistema de defesa enzimático consiste na atuação de enzimas da classe das oxidoredutases, as quais possuem como função eliminar as ROS dos organismos vivos. As enzimas - SOD, CAT e GPx - desempenham a conversão de radicais livres em moléculas estáveis por meio de reações em cascata, com atuação na sequência apresentada na Figura 5.

As enzimas superóxido dismutase (SOD) são metaloproteínas consideradas primeira linha de defesa contra o radical superóxido. Essas enzimas são responsáveis pela dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (BANNISTE e CALABRESE, 1987; FRIDOVICH, 1995).

A CAT é uma enzima tetramérica dependente de ferro presente em células de mamíferos, plantas e microrganismos. Essa enzima catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (DEISSEROTH e DOUNCE, 1970; SAINT-DENIS et al., 1998; PISOSCHI; POP, 2015). A GPx é uma enzima tetramérica

dependente de selênio, que catalisa a conversão de glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) (FLOHÉ e GONZLER, 1984).

1.6.2 SISTEMA DE DEFESA NÃO ENZIMÁTICO

O sistema de defesa não enzimático consiste no conjunto de substâncias que possuem capacidade de proteger o organismo contra as espécies reativas, dentre essas tem-se: ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, selênio, zinco, glutathiona reduzida (GSH), entre outros (MATES et al, 1999; FANG et al, 2002). A GSH constitui o sistema de defesa antioxidante não enzimático mais abundante dos mamíferos e desempenha importante função na eliminação das espécies reativas no tecido cerebral (RAVINDRANATH et al, 1989; para revisão ver DRINGEN et al, 2000).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo, formado por glicina, glutamato e cisteína, - com grupo tiol livre - pode doar elétrons para a redução de peróxidos, formando a glutathiona oxidada (GSSG). A GSH desempenha uma de suas funções antioxidante por meio da doação de elétrons para a redução de peróxidos na reação GPx (CHANCE et al., 1979) Figura 5.

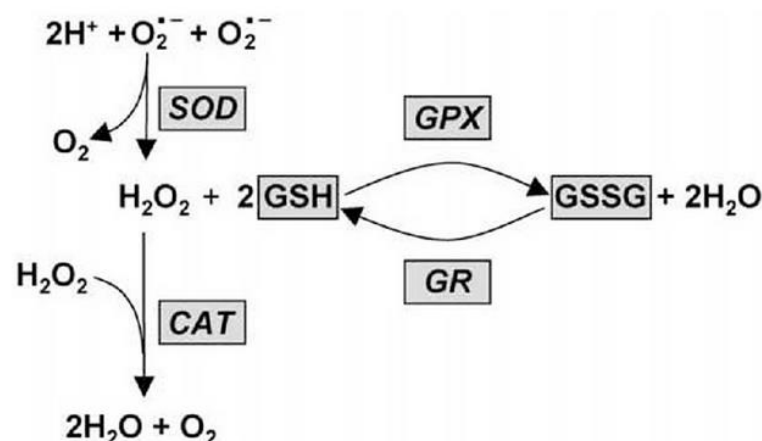


Figura 5. Diagrama da relação entre enzimas antioxidantes, GSH e GSSG. SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPX, glutathiona peroxidase; GR, glutathiona redutase; GSH, glutathiona reduzida; GSSG, glutathiona oxidada (BOROWICZ et al, 2016).

Com intuito de aumentar a disponibilidade do precursor limitante - cisteína - para a síntese de glutathiona, tem-se proposto o uso do medicamento N-acetilcisteína (NAC) (para revisão ver DRINGEN et al, 2000).

1.7 N-ACETILCISTEÍNA

A N-acetilcisteína (NAC) é considerada um fármaco seguro e bem tolerado que possui diversas indicações clínicas, tais como: tratamento de hepatotoxicidade por intoxicação com paracetamol, bronquite, fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica, dentre outras (COTGREAVE, 1997; KELLY, 1998; HEARD, 2008). Estudos têm indicado o uso da NAC em transtornos por uso de drogas, como: cocaína, heroína, nicotina e álcool (DEAN et al., 2011; MCCLURE et al., 2014; BOWERS et al., 2016). Uma vertente que corrobora o uso da NAC nesses transtornos se baseia na capacidade antioxidante desse fármaco (ARUOMA, 1998).

A NAC é um pró-fármaco, derivado da acetilação do grupo α -amino da cisteína (KELLY, 1998) (Figura 6). É comercializada como: sachê, xarope e para administração parenteral.

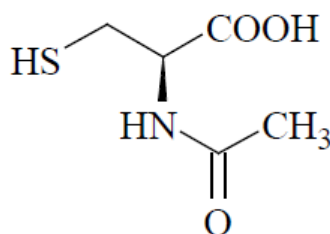


Figura 6. Estrutura molecular da N-acetilcisteína. Fonte: Farmacopéia brasileira 5ª edição)

A presença do resíduo de L-cisteína confere à NAC a característica de estimular a síntese de GSH pelo fornecimento de substrato cisteína (SMILKSTEIN et al., 1988; VRIES e FLORA, 1993; LUSHCHAK, 2012). Figura 7.

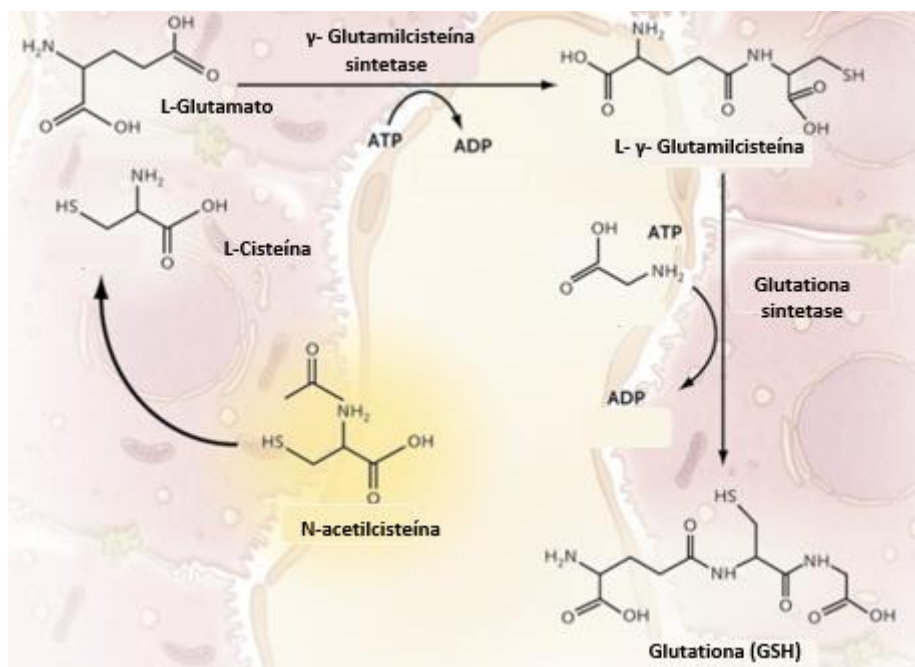


Figura 7. Esquema simplificado da síntese de GSH (HEARD, 2008).

Após a administração a NAC sofre o processo de desacetilação no fígado tendo como produto o resíduo de L-cisteína. No sistema nervoso a L-cisteína pode ser oxidada, e ocasionar aumento na disponibilidade de cistina, que participa da síntese de GSH por meio do antitransportador cistina/glutamato presente nas células gliais. O antitransportador cistina/glutamato desloca o glutamato para fora e cistina para dentro da célula na razão 1:1, assim regula os níveis de glutamato extracelular e facilitando a entrada de cistina na célula. Uma vez dentro da célula a cistina pode ser reduzida a cisteína, e usada como substrato na síntese de GSH (para revisão ver BERK et al., 2013).

O consumo de cocaína tem sido relacionado ao desenvolvimento de diversos problemas cognitivos, dentre esses o prejuízo na memória. Diante disso, estudos têm indicado o uso da NAC para o tratamento/ prevenção dos transtornos ocasionados por uso de cocaína. O nosso estudo teve como intuito pesquisar os efeitos do pré-tratamento NAC sobre a memória de reconhecimento em animais submetidos ao tratamento com cocaína, bem como avaliar os possíveis efeitos sobre o estresse oxidativo proteico no córtex pré-frontal e hipocampo desses animais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da N-acetilcisteína sobre parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo num modelo experimental de cocaína subaguda em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do pré-tratamento com N-acetilcisteína sobre a memória de animais tratados com cocaína por meio de teste de reconhecimento de objetos.

Avaliar os efeitos do pré-tratamento com N-acetilcisteína sobre parâmetros oxidantes e antioxidantes em cérebro de animais tratados com cocaína por meio da avaliação de:

- ✓ Dosagem de glutathione reduzida (GSH);
- ✓ Razão de glutathione reduzida/glutathione oxidada (GSH/GSSG);
- ✓ Estresse oxidativo proteico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

A amostra bruta de cocaína de rua foi cedida pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo. A N-acetilcisteína 99% (Sigma-Aldrich), ácido 5-sulfossalicílico (Amresco), DTNB (sigma-aldrich), glutathione redutase (Sigma-Aldrich), NADPH (Cayman), 2-vinilpiridina (Sigma-Aldrich), glutathione oxidada (Sigma-Aldrich), glutathione reduzida (Sigma-Aldrich), Kit Oxyblot (Merk), padrão de cocaína (Cerilliant) e padrão de cocaína-D3 (Cerilliant).

3.2 ANIMAIS

Foram empregados 54 ratos *Wistar*, machos, pesando aproximadamente 150-200 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram transferidos para a sala de manutenção do Laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia (LCCNPF) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (CCS/UFES) e mantidos em gaiolas individuais em um ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$), umidade relativa de 50% – 70%, ciclo claro-escuro artificial de 12h (luzes acesas às 7 h), com ração própria para roedores e água *ad libitum*. Neste estudo foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br), que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa envolvendo animais. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do CCS/UFES (protocolo nº 69/2016).

3.3 DOSAGEM DA COCAÍNA NA DROGA BRUTA

A concentração de cocaína na droga bruta, cocaína de rua, foi determinada por cromatografia gasosa (CG-MS) da Agilent. Para a análise foi empregada coluna cromatográfica capilar HP-5MS (Agilent Technologies), 30 m x 0,25 um d.i., espessura do filme 0,25 um; programa de temperatura: temperatura inicial de 100 por 1 min, 5°C/min até 130°C, 15°C/min até 230°C por 2 min e depois 10°C/min até 290°C por 3min. O fluxo de hélio foi mantido a 1.1mL/min. Volume de injeção de 1uL. Tempo de corrida 24.667 min.

A curva de calibração foi realizada com padrão de cocaína nas concentrações (50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 ng/mL) e como padrão interno foi utilizado padrão de cocaína-D3.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Animais foram separados em 6 grupos, e receberam tratamentos por 10 dias consecutivos. Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal.

Cloridrato de cocaína (Coc) foi solubilizado em solução salina estéril pH 7.2, (soluções contendo 5mg/mL e 10mg/mL foram respectivamente utilizadas para a administração das doses de 5mg/Kg e 10 mg/Kg de cocaína. A N-acetilcisteína (NAC) foi solubilizada em solução salina estéril, e o pH corrigido para 7.2 com NaOH 10M (solução na concentração 150 mg/mL foi utilizada para administração da dose de 150 mg/Kg).

- **Grupo Controle** – Animais submetidos a duas administrações de salina, com intervalo de 60 min entre as administrações;
- **Grupo NAC-Salina** – Animais submetidos ao tratamento com NAC 150 mg/mL e posteriormente tratados com salina, com intervalo de 60 min entre as administrações;
- **Grupo Salina-Coc 5** – Animais submetidos ao tratamento com salina e

posteriormente tratados com cocaína 5mg/mL com intervalo de 60 min entre as administrações;

- **Grupo NAC-Coc 5** – Animais submetidos ao tratamento com NAC (150mg/mL) e posteriormente tratados com cocaína 5mg/mL, com intervalo de 60 min entre as administrações;
- **Grupo Salina-Coc 10** – Animais submetidos ao tratamento com salina e posteriormente tratados com cocaína 10mg/mL, com intervalo de 60 min entre as administrações;
- **Grupo NAC-Coc 10** – Animais submetidos ao tratamento com NAC 150mg/mL e posteriormente tratados com cocaína 10mg/mL, com intervalo de 60 min entre as administrações.

Os animais foram levados ao teste comportamental no 7º dia para habituação, no 8º dia para a sessão treino e após 1h 30min para o teste de memória de curta duração (STM) e no 9º dia para o teste de memória de longa duração (LTM). Os animais foram submetidos aos testes 10 min após a finalização dos protocolos de administração das drogas, exceto para o teste de LTM, uma vez que para realização desse teste os animais ficaram abstinentes por 24h, e receberam os tratamentos somente após a realização do teste de LTM. A eutanásia dos animais foi realizada no 10º dia, uma vez que a extensa carga horária dispensada com os tratamentos e testes comportamentais realizados no 9º dia impossibilitaram a realização da eutanásia no 9º dia. No 10º dia de tratamento os animais foram eutanasiados por decapitação – 10 min após a finalização dos protocolos de tratamento - para remoção de tecido cerebral, o córtex pré-frontal e o hipocampo, os quais foram dissecados e estocados à – 80º C para análises bioquímicas (Figura 8).

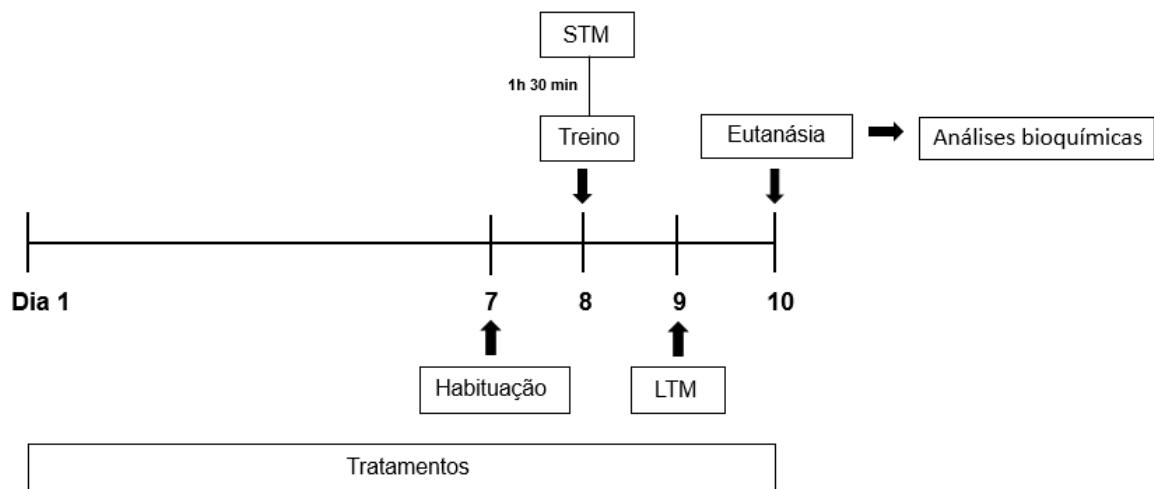


Figura 8. Representação esquemática do desenho experimental. Memória de curta duração (STM). Memória de longa duração (LTM).

3.5 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (TRO)

As sessões do TRO foram realizadas seguindo protocolo adaptado da metodologia de Ennaceur e Delacour (1988). Os animais foram submetidos a sessão de habituação no 7º dia de tratamento. Nessa etapa os animais permaneceram, sem nenhum objeto, por 10 min em caixa de campo aberto com dimensões (600mm x 600mm x 450mm). Após 24 h - 8º dia de tratamento - os ratos foram submetidos a sessão treino com dois objetos idênticos (A1 e A1) dispostos na diagonal do campo aberto e permaneceram em teste por 5 min. Uma hora e 30 minutos após término da sessão treino, foi avaliada a memória de curta duração (STM), os ratos foram novamente submetidos a 5 min em campo aberto, porém com um objeto familiar (A1) e um objeto novo (B1). Para testar a memória de longa duração (LTM) o animal retornou ao campo aberto, 24 horas após a sessão treino, com um objeto familiar (A1) e um objeto novo (C1). Nessa última sessão também teve 5 minutos para explorar o ambiente (IZQUIERDO et al., 1998). O desenho esquemático do TRO está ilustrado na Figura 9. Todos objetos utilizados nas sessões foram dispostos a 15 cm de distância das paredes laterais. O tempo de exploração de cada objeto foi registrado pelo software Any-maze, para posterior análise do índice de reconhecimento.

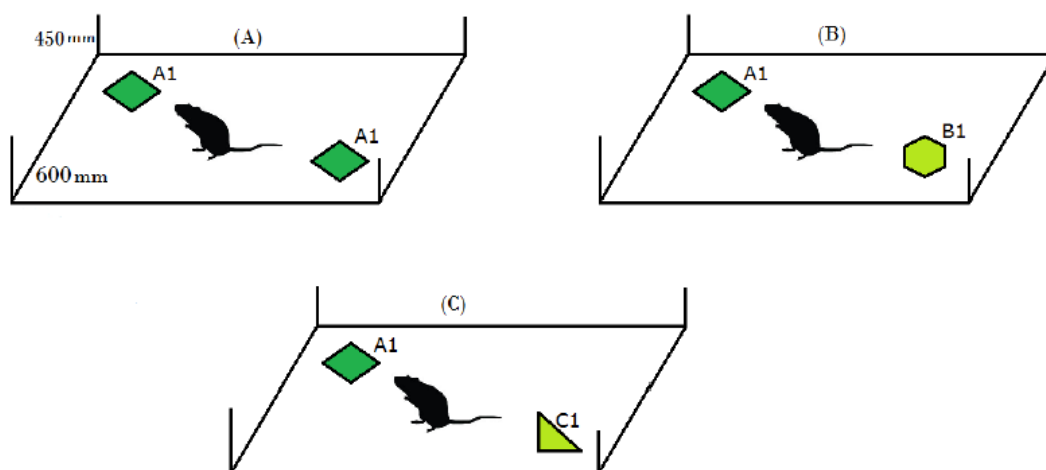


Figura 9. Esquema das etapas do teste de reconhecimento de objetos. A) Treino: A1 são objetos idênticos; (B) MCP: A1 (objeto familiar) e B1 (objeto novo); (C) MCP: A1 (objeto familiar) e C1 (objeto novo).

O Índice de Reconhecimento (%IR) foi calculado por meio da porcentagem entre a relação do tempo de exploração do objeto novo e o tempo de exploração do objeto familiar. O índice de reconhecimento foi calculado pela fórmula $TN / (TA + TN) \times 100$, onde TN é o tempo gasto para explorar o objeto novo e TA é o tempo gasto para explorar o objeto familiar. $IR > 50\%$ indica o reconhecimento do objeto familiar.

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para a análise da concentração de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e da razão GSH/GSSG os tecidos do córtex pré-frontal e hipocampo foram homogeneizados em ácido de sulfossalicílico (SSA) 5% na proporção de 1:10 m/v. O homogenato foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos, a $4^{\circ}C$.

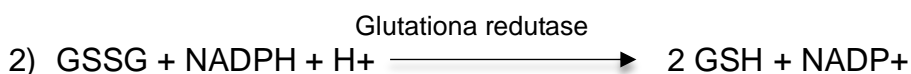
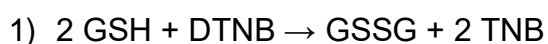
O sobrenadante foi utilizado para dosagem de GSH. Para a dosagem de GSSG o homogenato foi submetido a derivatização com 2-vinilpiridina (GRIFFITH, 1980).

A extração proteica dos tecidos (córtex pré-frontal e hipocampo) foi realizada, na relação m/v (1:10), em tampão fosfato de sódio 20mM com KCl 140 mM (pH 7.4) adicionado de coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich) 1% (v/v), em Potter por 2 min à 0–4°C. Os homogenatos foram centrifugados 10.000 g por 10 min à 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos para as análises de carbonilação proteica. O conteúdo proteico nas amostras obtidas foi determinado pelo método de Lowry utilizando Soro albumina bovino (LOWRY et al, 1951).

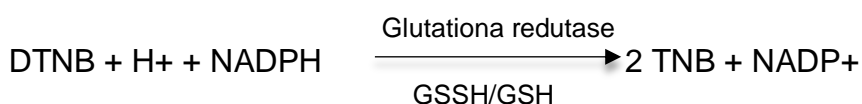
3.7 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE

3.7.1 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA E RAZÃO GSH/GSSG

O conteúdo de glutathiona total (GSH) e dissulfeto de glutathiona (forma “oxidada”, GSSG) foi determinado no homogenato de córtex pré-frontal e hipocampo utilizando o método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) e GSSG redutase (GRIFFITH, 1980). Este ensaio utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412 nm e/ou 405 nm, conforme descrito nas seguintes reações:



A combinação das duas reações:



Para dosagem da GSH, 10 μ L do sobrenadante foram colocados em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 150 μ L da mistura de trabalho [95 mM de tampão fosfato (pH 7,0), 0,95 mM de EDTA, 48 μ M de NADPH, 0,031 mg/mL de DTNB, 0,115 unidades/mL de glutathione redutase e 0.24% de ácido sulfossalicílico]. As amostras foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 μ L de NADPH (0,16mg/mL) foram adicionados e o cronômetro disparado. A formação do TNB foi acompanhada pela leitura das absorbâncias a 405 nm realizadas a cada minuto, durante 5 minutos, em leitor de ELISA.

O procedimento utilizado para a dosagem da GSSG foi o mesmo da glutathione total, porém para esta análise a amostra passou por uma etapa de derivatização antes da dosagem. Nesse processo, 2 μ L de 2-vinilpiridina foram adicionados em 100 μ L dos homogenatos de córtex pré-frontal e hipocampo. O pH dos homogenatos foi ajustado para valores entre 6 e 7 utilizando trietanolamina (TEA). Após incubação por 60 minutos, as amostras derivatizadas foram utilizadas no ensaio de acordo com o mesmo procedimento descrito acima.

As absorbâncias de diluições seriadas de soluções padrão de glutathione reduzida e oxidada foram determinadas separadamente para obtenção das curvas de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar as concentrações em nmoles de glutathione total e oxidada por mL de amostra.

3.7.2 ESTRESSE OXIDATIVO PROTEICO

O índice de carbonilação de proteínas foi avaliado pelos métodos de determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e utilizando o kit Oxyblot Merk®.

Os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) foram avaliados como descrito por Witko-Sarsat (1998) e colaboradores utilizando microplaca de Elisa de 96 poços. As análises foram realizadas seguindo a relação m/v (1:3), 70 μ L do homogenato

proteico do córtex pré-frontal e hipocampo e 140 uL de tampão fosfato de sódio 20mM com KCl 140 mM (pH 7.4). Para análise da carbonilação proteica foi confeccionada uma curva de Cloramina T (5 a 100 uM). Nos poços das amostras e da curva de Cloramina foi adicionado 10uL de iodeto de potássio (1,16 mol/L) e 20 uL de ácido acético glacial. Após a adição do ácido a placa foi levemente agitada por 6 min e a leitura da absorbância da cloramina T foi realizada a 340 nm. As concentrações de AOPP foram expressas em uM de Cloramina T/ mg de proteína.

Índice de proteínas carbonizadas foi também avaliado por Western Blotting usando o kit de Oxyblot conforme descrito pelo fabricante.

Esta análise foi realizada com 5 replicatas biológicas de cada grupo analisado (cinco animais). De forma resumida, duas alíquotas do extrato proteico (contendo 25ug de proteína) de cada animal foi acrescido de 5 uL de SDS 12%. Uma das alíquotas foi submetida a derivatização pela adição de 10 uL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), e a outra (não derivatizadas) foi adicionado o mesmo volume de solução controle de derivatização (controle negativo). Após 15 minutos de reação - 15 min em temperatura ambiente - foi adicionado 7,5 uL de solução de neutralização. Estas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e posteriormente transferidas para membrana de PDVF.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo primário de coelho anti-DNP (diluição 1: 150) por 1h a 18 - 25 ° C com agitação suave. Após lavagem as membranas foram incubadas com anticorpo secundário IgG anti-coelho de cabra (conjugado com HRP) (diluição 1:300) em solução de bloqueio. Foi utilizada substância quimioluminescente (ECL Plus, AmershamTM, GE Healthcare, UK) para revelação das bandas imunorreativas pelo *ChemiDoc* (Bio-Rad). A amostra não derivatizada foi utilizada como branco.

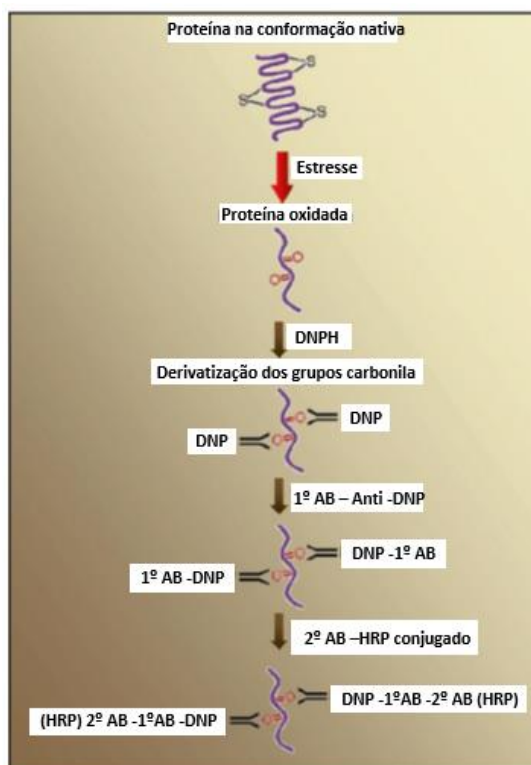


Figura 10. Representação esquemática das etapas do Oxyblot (STANKOWSKI et al., 2011).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação do índice de reconhecimento de objeto foi realizado ANOVA de duas vias e post-hoc Bonferroni. A avaliação da concentração de GSH (nmol/mL), GSH/GSSG (nmol/mL) e AOPP (uM de Cloramina T/ mg de proteína) foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. A avaliação do índice de carbonilação proteína, pela metodologia de Oxyblot, foi realizada ANOVA 1 via com Dunn's Multiple Comparison Test. As análises dos dados de imagem do teste comportamental foram realizadas pelo programa Any-maze®. As análises de imagem do Western Blotting foram realizadas pelo software ImageLab®. Para as análises estatísticas e representação gráfica foi utilizado o programa GraphPad Prism®, versão 7.0. Para todas as análises foi considerado um nível de significância para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 PERCENTUAL DE COCAÍNA NA DROGA BRUTA E ADULTERANTES

A concentração de cocaína na amostra da droga utilizada foi determinada por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-MS). A separação cromatográfica mostrou que a droga bruta utilizada contém adulterantes (Figura 11).

A identificação dos componentes – presentes na amostra - foi feita pela análise dos produtos de fragmentação e tempo de retenção: o componente com tempo de retenção (12.45 min) corresponde a lidocaína, (13.44 min) a cafeína e (16.82 min) a cocaína. As figuras 11B, 11C e 11D mostram perfis obtidos e as abundâncias relativas dos produtos de fragmentação destas moléculas.

O conteúdo de cocaína na amostra correspondeu a 23%, e foi estimado utilizando curva de calibração, obtida pela integração da área dos picos dos padrões de cocaína.

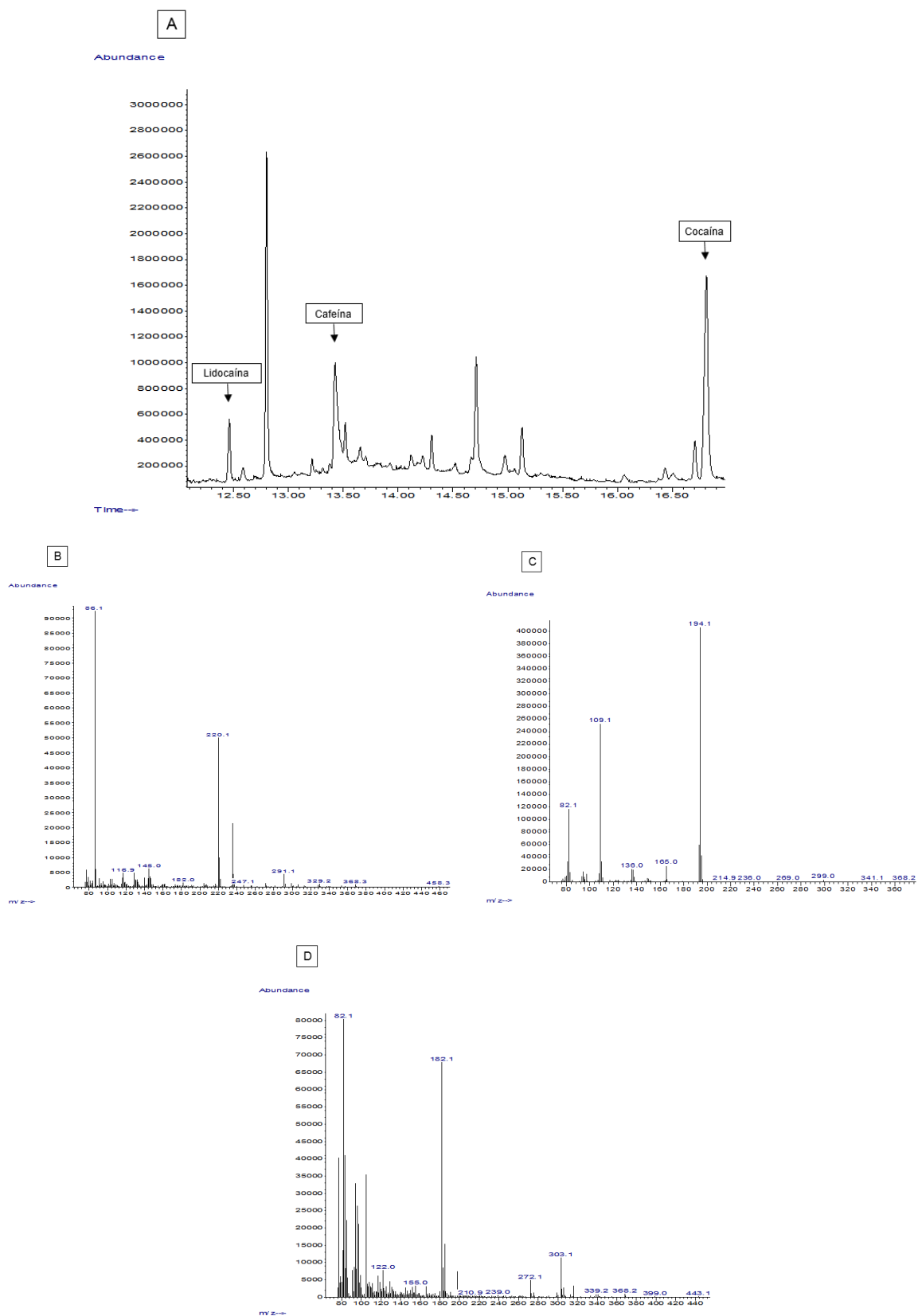


Figura 11. Cromatograma da droga bruta (A). Identificação dos componentes da amostra por fragmentação por impacto eletrônico; lidocaína (B); cafeína (C); cocaína (D).

4.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

A avaliação da memória permitiu a identificação de prejuízo no índice de reconhecimento do objeto familiar nos grupos tratados com cocaína, e que o pré-tratamento com NAC foi capaz de prevenir o dano cognitivo no grupo submetido a maior dose de cocaína -10mg/Kg. (Fig. 12 e 13).

Os resultados da avaliação da STM evidenciaram que os animais do grupo Salina-Coc-10 apresentaram índice de reconhecimento do objeto familiar inferior ao do grupo Salina-Coc-5 ($p=0,0027$) e animais controle ($p=0,005$), respectivamente. Os animais previamente tratados com NAC seguido de cocaína 10mg/Kg (grupo NAC-Coc-10) não apresentaram diferença significativa no IR quando comparados com os animais do grupo Salina-Coc-10. (Fig. 12).

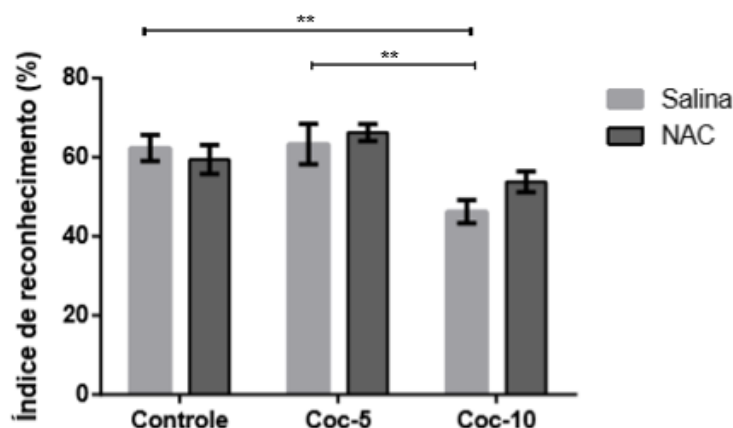


Figura 12. Índice de reconhecimento de objeto familiar na memória de curta duração (STM). ** $p<0,005$ e * $p<0,05$. ANOVA 2 vias post-hoc Bonferroni ($n=8-9$). Dados representados média \pm EPM.

A avaliação da LTM demonstrou que os animais do grupo Salina-Coc-5 ($p=0,0411$) e Salina-Coc-10 ($p=0,033$) apresentaram redução no IR quando comparados aos animais controle, com diferença significativa $p<0,05$. E que os animais previamente

tratados com NAC seguido de cocaína 10mg/Kg (grupo NAC-Coc-10) apresentaram melhora do IR em relação aos animais do grupo Salina-Coc-10, com diferença significativa $p=0,001$ (Fig. 13).

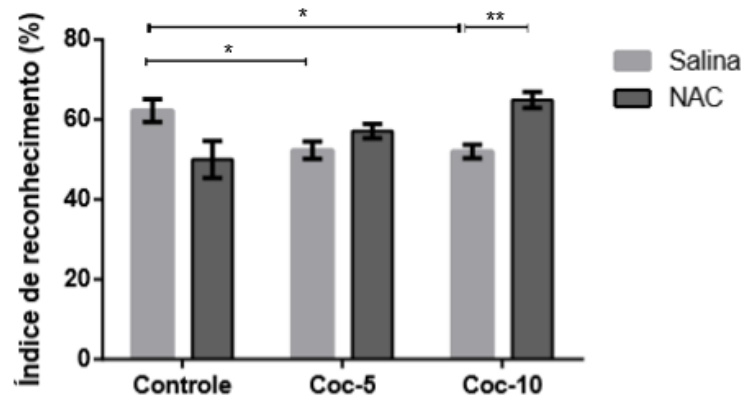


Figura 13. Índice de reconhecimento de objeto familiar na memória de longa duração (LTM). ** $p=0,001$ e * $p<0,05$. ANOVA 2 vias post-hoc Bonferroni ($n=8-9$). Dados representados média \pm EPM.

4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

As análises bioquímicas foram realizadas para ampliar o conhecimento do efeito do consumo de diferentes doses de cocaína e sobre o estresse oxidativo cerebral e também avaliar o potencial efeito neuroprotetor da NAC. Possíveis alterações no balanço redox nos grupos experimentais foram avaliadas por meio de dosagens de biomarcadores do estresse oxidativo: GSH, GSSG e razão GSH/GSSG, e índice de carbonilação proteica.

4.3.1 CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA E RAZÃO GSH/GSSG

As figuras 14 e 15 mostram os resultados da dosagem de GSH no córtex pré-frontal e no hipocampo, respectivamente. Apesar de uma maior dispersão entre as replicatas biológicas no grupo controle, a análise dos dados mostrou que não há diferença significativa no nível de glutathiona reduzida entre os grupos estudados nestes tecidos.

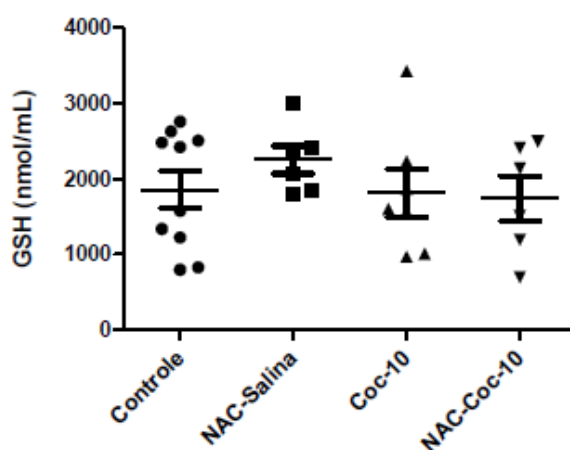


Figura 14 Dosagem de Glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal. Kruskal-Wallis test (n= 5-10). Dados representados média \pm EPM.

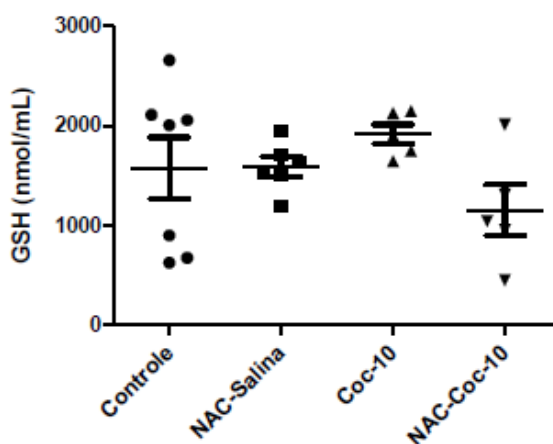


Figura 15 Dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) no hipocampo. Kruskal-Wallis test (n= 5-7). Dados representados média \pm EPM.

Também foi avaliada a razão GSH/GSSG nos grupos experimentais. Esta relação é considerada um dos principais marcadores do potencial redox celular, um maior valor é indicativo de maior potencial antioxidante. A figura 16 mostra os resultados da razão GSH/GSSG no córtex pré-frontal, observa-se que não houve diferença significativa deste parâmetro entre os grupos estudados.

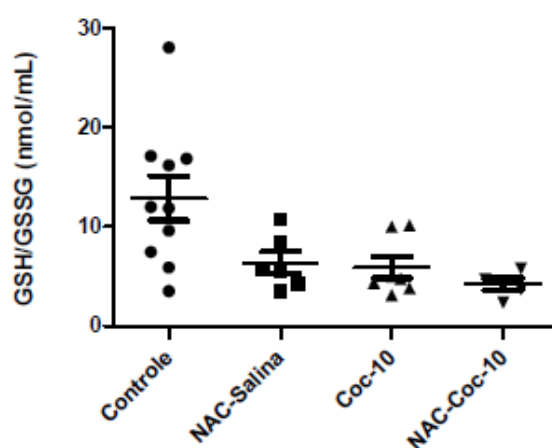


Figura 16 Razão entre GSH/GSSG no córtex pré-frontal. Kruskal-Wallis test (n= 5-10). Dados representados média ± EPM.

Assim como no córtex pré-frontal, o hipocampo dos grupos estudados não apresentou diferença significativa na razão GSH/GSSG (Fig. 17).

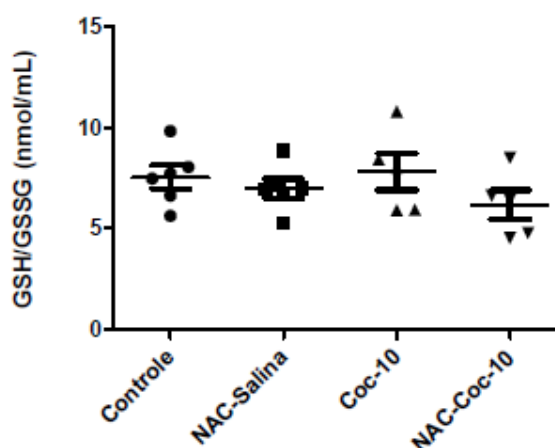


Figura 17 Razão entre GSH/GSSG no hipocampo. Kruskal-Wallis test(n=5-6). Dados representados média ± EPM.

4.3.2 ESTRESSE OXIDATIVO PROTEICO

Considerando que a carbonilação de proteínas é um indicador inespecífico de estresse oxidativo proteico, avaliou-se os possíveis efeitos da cocaína sobre o estresse proteico e o potencial protetor da NAC, usando dois métodos.

Quando esta análise foi realizada utilizando a metodologia de AOPP, não foram detectadas diferenças significativas no índice de carbonilação proteica no córtex pré-frontal (figura 18) e no hipocampo (figura 19).

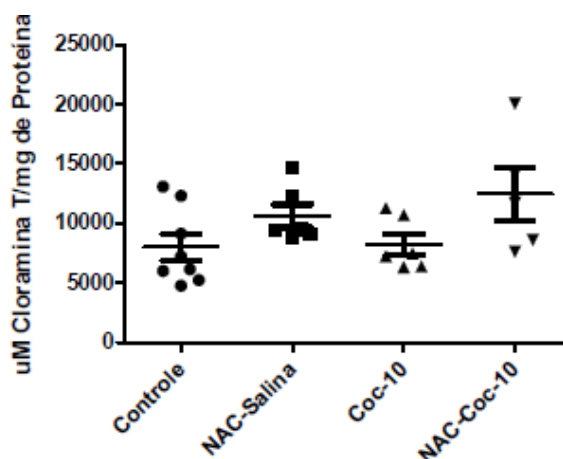


Figura 18 Proteínas carboniladas no córtex pré-frontal. Kruskal-Wallis test (n= 5-6). Dados representados média \pm EPM. Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP).

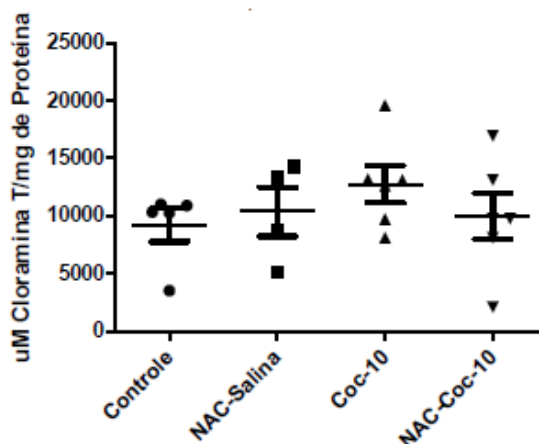


Figura 19 Proteínas carboniladas no hipocampo. Kruskal-Wallis test (n= 5-6). Dados representados média \pm EPM. Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP).

Também avaliamos o índice de carbonilação proteica utilizando o imuno-ensaio - oxyblot - resultados desta análise são mostrados nas figuras 20 e 21.

As figuras 20A e 21A, mostram os perfis de carbonilação proteica obtidos do córtex pré-frontal e do hipocampo dos grupos experimentais, por inspeção visual pode-se perceber maior intensidade de carbonilação de proteínas no grupo Salina-Coc 10, e menor no grupo Nac-Coc 10, em ambos tecidos analisados.

Quando a análise da intensidade foi avaliada por densitometria (software ImageLab Bio-Rad), usando o resultado da intensidade das bandas provenientes de uma replicata biológica de cada grupo experimental, os dados mostraram que, o grupo Salina Coc-10 apresentou intensidade de carbonilação proteica maior quando comparada ao grupo Controle, NAC-salina e NAC Coc-10, tanto no CPF quanto no HPC, apesar de não significativa (Figuras 20B e 21B).

A análise da densidade carbonilação proteica, da média de cinco replicatas biológicas de cada grupo experimental do córtex pré-frontal, evidenciou que os animais do grupo NAC-Salina e Salina Coc-10 não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Controle. Entretanto, animais do grupo NAC Coc-10 apresentaram uma redução de 49% na densidade de proteínas carboniladas quando comparada ao grupo NAC – Salina ($p=0,0272$) (Figura 20C).

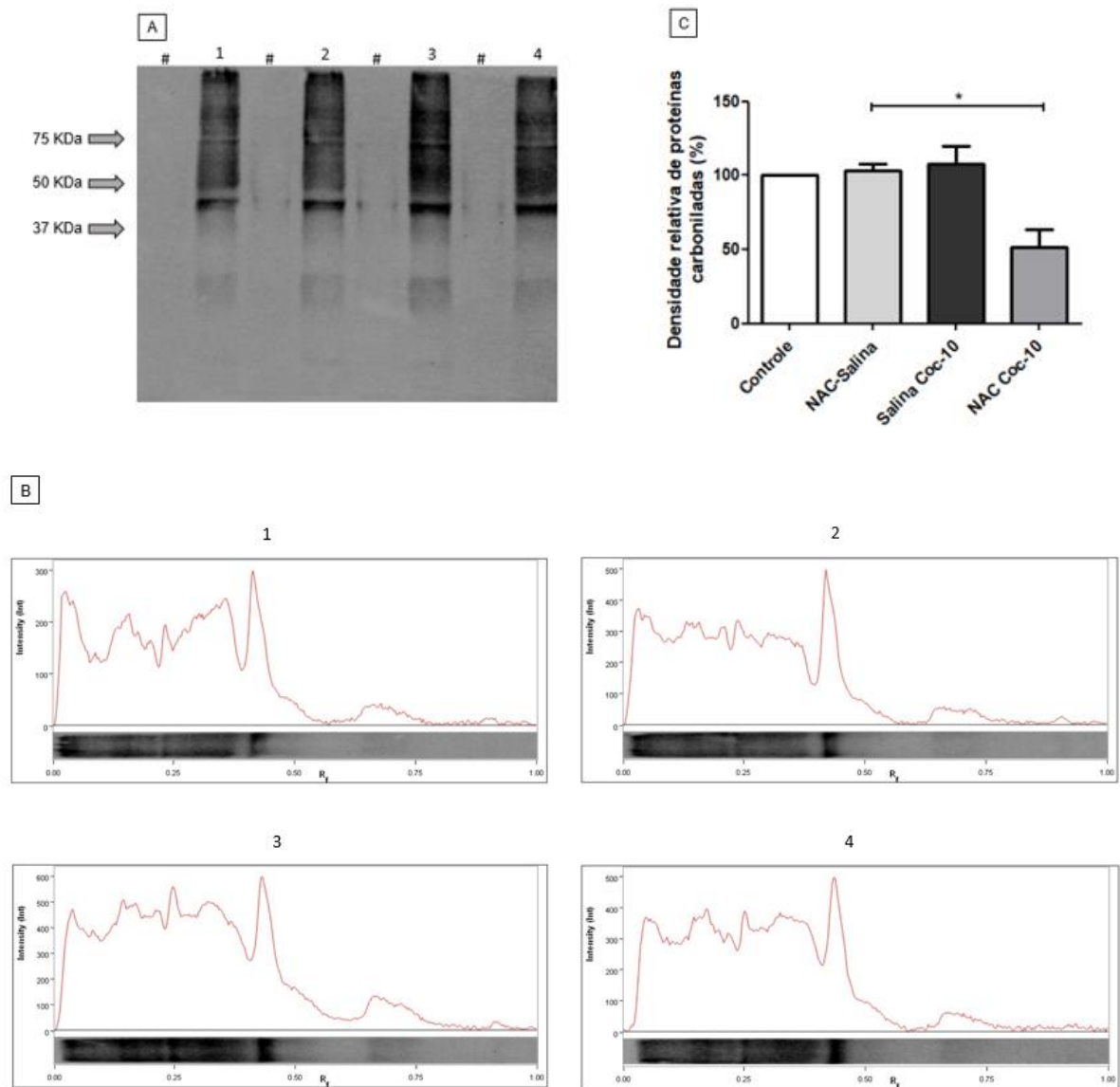


Figura 20. Análise da carbonilação de proteína do córtex pré-frontal por Oxyblot. (A) Western blotting com replicata biológica de cada grupo experimental (1-Controle, 2-NAC-Salina, 3-Salina Coc-10, 4-NAC Coc-10). (B) Gráfico de densitometria com replicata biológica de cada grupo experimental (1-Controle, 2-NAC-Salina, 3-Salina Coc-10, 4-NAC Coc-10). (C) Análise gráfica da densidade relativa da carbonilação de proteína da média de cinco replicatas biológicas de cada grupo experimental. * $p < 0,05$. ANOVA 1 via com Dunn's Multiple Comparison Test ($n=5$). Dados representados média \pm EPM. Para a avaliação do índice de carbonilação de proteínas nos grupos estudados, a densidade do grupo controle foi considerada 100% em cada blot. A efetividade do método foi comprovada pelo não aparecimento de banda nas amostras não derivatizadas (#).

A análise da densidade de carbonilação proteica, da média de cinco replicatas biológicas de cada grupo experimental do hipocampo, evidenciou que os animais do

grupo NAC-Salina e Salina Coc-10 não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Entretanto, animais do grupo NAC Coc-10 apresentaram uma redução de 46% na densidade de proteínas carboniladas quando comparada ao grupo Controle ($p=0,0207$) (Figura 21C).

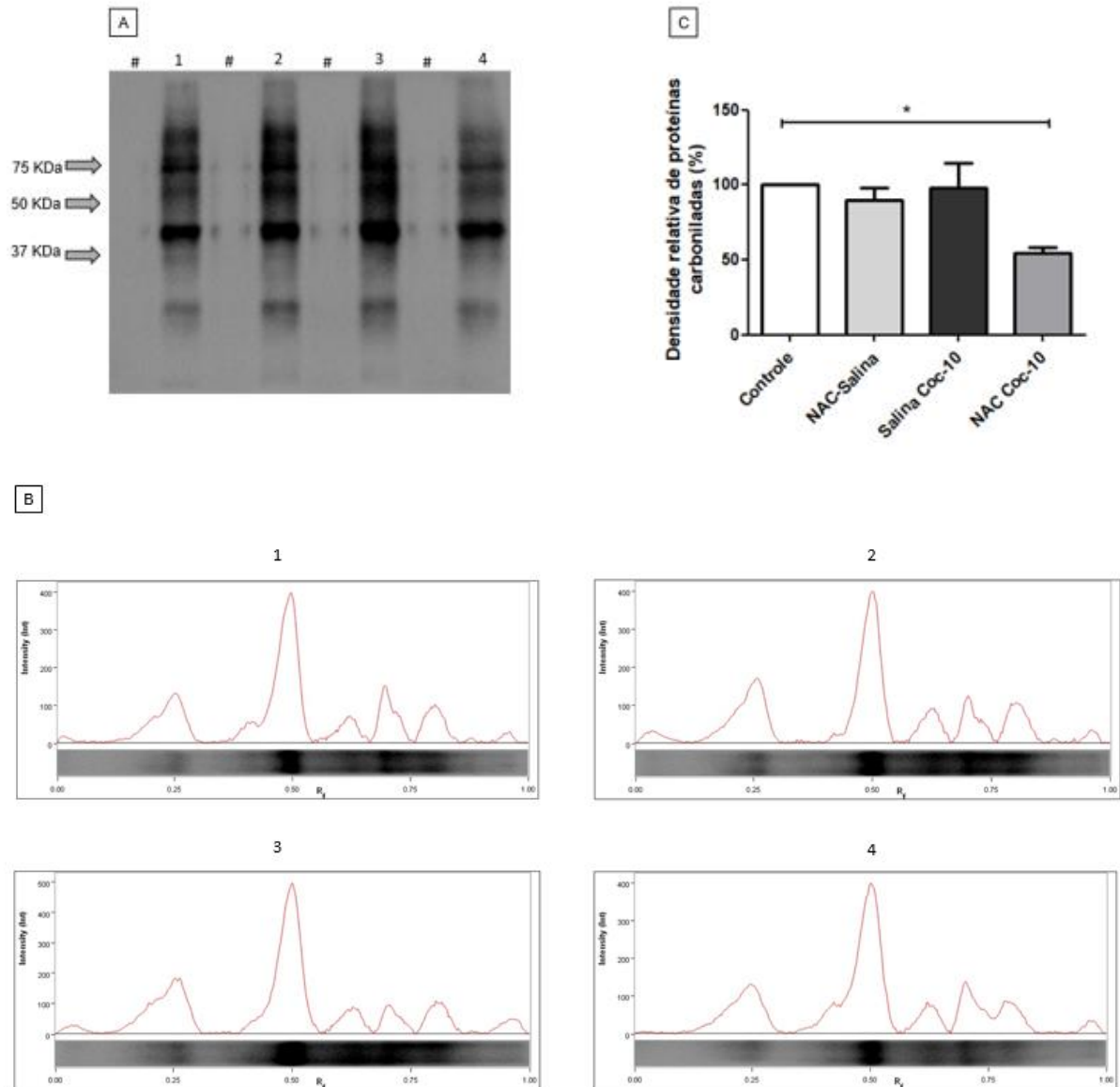


Figura 21. Análise da carbonilação de proteína do hipocampo por Oxyblot. (A) Western blotting com replicata biológica de cada grupo experimental (1-Controle, 2-NAC-Salina, 3-Salina Coc-10, 4-NAC Coc-10). (B) Gráfico de densitometria com replicata biológica de cada grupo experimental (1-Controle, 2-NAC-Salina, 3-Salina Coc-10, 4-NAC Coc-10). (C) Análise gráfica da densidade relativa da carbonilação de proteína da média de cinco replicatas biológicas de cada grupo experimental. * $p < 0,05$. ANOVA 1 via com Dunn's Multiple Comparison Test ($n=5$). Dados representados média \pm EPM. Para a avaliação do índice de carbonilação de proteínas nos grupos estudados, a densidade do grupo controle foi considerada 100% em cada blot. A efetividade do método foi comprovada pelo não aparecimento de banda nas amostras não derivatizadas (#).

5. DISCUSSÃO

Os efeitos da cocaína sobre a memória e aprendizagem têm sido objeto de diversos estudos, uma vez que esta droga altera o funcionamento neuronal de regiões cerebrais envolvidas na codificação da memória. Com o intuito de prevenir ou até mesmo reverter os danos ocasionados pela cocaína sobre a memória, a literatura tem destacado o uso de diversos medicamentos, dentre esses a NAC.

Nesse trabalho foi demonstrado que a N-acetilcisteína (NAC) foi capaz de prevenir, pelo menos em parte, o prejuízo ocasionado pela cocaína na memória, como também contribuiu para homeostase oxidativa de proteínas.

Os achados do presente trabalho sobre o prejuízo ocasionado pela cocaína na memória de reconhecimento estão de acordo com outros estudos descritos na literatura. Uma vez que dados da literatura têm apontando que a cocaína produz efeitos amnésicos em humanos e animais de laboratório (SERPER et al., 2000 ;NIIGAKI et al., 2010). Além disso, pesquisas evidenciaram que usuários de cocaína apresentam maiores riscos em desenvolver prejuízos cognitivos relacionados a memória, principalmente, em atividades que envolvem a atenção, memória em tarefas verbais e memória operacional (para revisão ver POTVIN et al., 2014).

Os efeitos da cocaína sobre a memória dependem de diversos fatores, como: a dose, o tempo de tratamento (agudo, subcrônico e crônico), a dinâmica de administração (antes do treinamento, afetando a aquisição da memória ou após o treinamento, afetando a consolidação ou recuperação da memória (TAKAHASHI et al., 2008; CUNHA-OLIVEIRA et al., 2014).

No presente trabalho nós avaliamos o efeito cumulativo de duas doses de cocaína (5mg/Kg e 10mg/Kg) na memória de ratos submetidos ao protocolo de memória de reconhecimento no oitavo dia (STM) e nono dia (LTM) de tratamento. Nós observamos que a maior dose de cocaína ocasionou prejuízo na memória de curto e longo prazo. A menor dose de cocaína somente ocasionou prejuízo na memória de longo prazo.

Estudos utilizando protocolos comportamentais com dinâmica de administração de cocaína, semelhantes ao nosso trabalho, demonstraram déficits na memória/aprendizagem após administração de cocaína. A administração aguda de

cocaína, nas doses de 7.5, 10, 15 ou 30 mg/kg, 5 e 30 minutos antes da sessão treino ocasionou déficit na aquisição de memória no teste de esquiva discriminativa (NIIGAKI et al., 2010). O tratamento subcrônico com altas doses de cocaína (20 e 40 mg/Kg) ocasionaram déficits de memória no teste de labirinto aquático (QUIRK et al., 2001).

Para realização deste trabalho foi utilizada uma amostra de droga bruta de cocaína de rua, normalmente consumida por usuários de drogas, apreendida pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo. Tem sido relatado que as amostras de cocaína de rua apresentam adulterantes, os quais também podem causar efeitos nos usuários (BERNARDO et al., 2003).

Para avaliar o lote da amostra bruta empregada nesse trabalho, foi realizada análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-MS). Esta análise mostrou que 23% da droga bruta corresponde à cocaína, e também permitiu a detecção de cafeína e lidocaína.

As doses utilizadas neste trabalho foram ajustadas pelo conteúdo de cocaína bruta, entretanto parte do prejuízo na memória pode ter sido acarretado pela cafeína.

Além dos efeitos amnésicos ocasionados pela cocaína, estudo têm demonstrado que a cafeína – adulterante comumente encontrado na cocaína de rua – também está relacionada a déficits na aquisição da memória quando administrada em altas doses (30mg/Kg -100mg/Kg) antes da sessão de treino (ANGELUCCI et al., 1999; BERNARDO et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2008). Este efeito também foi demonstrado por Izquierdo e colaboradores, quando ratos tratados com cafeína previamente a sessão treino apresentaram prejuízo na memória de longo prazo (24h) (IZQUIERDO et al, 1979).

Tanto a cocaína quanto a cafeína aumentam a disponibilidade de dopamina nas sinapses do Sistema Nervoso Central atuando em sinergismo. A cafeína, promove o aumento na liberação dos neurotransmissores de dopamina por meio do antagonismo nos receptores de adenosina localizados nos neurônios que compõem o circuito de recompensa (SNYDER et al., 1981; ACQUAS et al., 2002; CAULI e MORELLI, 2005). E a cocaína intensifica a neurotransmissão dopaminérgica, visto que atua como um potente bloqueador do transportador responsável pela recaptação de DA (RITZ et al., 1987 ; HYMAN e MALENKA, 2001).

A dopamina é um neurotransmissor chave para regulação de processos cognitivos. Diante disso, tem-se evidenciado que a neurotransmissão dopaminérgica regula as funções cerebrais que influenciam a memória através de processos que envolvem a recompensa, atenção e o medo (CROPLEY et al., 2006). E que a melhora no desempenho da memória de reconhecimento tem sido associada a ativação da dopamina sobre os receptores D1 (LIMA et al., 2011)

No entanto, é importante destacar que, dependendo do nível de estimulação, a ativação dos receptores D1 pode ocasionar prejuízo na memória de reconhecimento de objetos (LIMA et al., 2011). Com isso, podemos sugerir que o déficit de memória que observamos nos animais tratados com cocaína na concentração de 10mg/Kg, pode ser uma consequência do aumento no disparo dopaminérgico. E que a menor exploração do objeto novo no dia dos testes (STM e LTM) pode ser explicada por um déficit na aprendizagem inicial, ou seja, na seção treino.

Como descrito na introdução, a codificação da memória de reconhecimento envolve a ativação de diversas regiões cerebrais, como: córtex perirrinal, hipocampo, córtex pré-frontal e tálamo, e está relacionada a capacidade de julgar a ocorrência prévia de estímulos/eventos e a habilidade para orientar o comportamento prospectivo (BARKER et al., 2007; BALDERAS et al., 2014; para revisão ver WARBURTON e BROWN, 2015).

A memória é um fenômeno complexo, cada região que compõem a memória de reconhecimento processa informações específicas. Com isso, os córtex perirrinal e pré-frontal processam as informações dos objetos, enquanto o córtex entorrinal e o hipocampo processam as informações contextuais em que os objetos foram experimentados (BALDERAS et al., 2014).

Considerando que a cocaína prejudica a memória, uma das hipóteses para o déficit na memória de reconhecimento, no presente trabalho, pode estar relacionada a prejuízos nas funções cognitivas desempenhadas pelo córtex pré-frontal. Uma vez que estudos têm evidenciado que a exposição repetida a drogas de abuso prejudica as funções cognitivas do CPF (KESNER et al., 1996; FERGUSON e GAO, 2015; para revisão ver EVERITT, 2014).

Para tanto as evidências comportamentais e fisiológicas indicam que há uma faixa normal da função da dopaminérgica no córtex pré-frontal que pode ser descrita como

uma relação “U invertido” entre a transmissão de dopamina e a integridade da memória (WILLIAMS e CASTNER, 2006). Assim, a estimulação excessiva do receptor D1 se torna deletéria para aspectos críticos da cognição. Dessa forma, há evidências de que a estimulação do receptor de dopamina tem uma influência excitatória nos interneurônios GABAérgicos pré-frontais, e que indiretamente geram correntes pós-sinápticas inibitórias em neurônios piramidais, e como consequência ocasionam redução nas respostas relacionadas à memória (ZHOU E HABLITZ, 1999; GOLDMAN-RAKIC et al., 2000).

O prejuízo nas memórias de curto e longo prazo encontrados no presente estudo podem ser, em partes, explicadas por neuroadaptações nas regiões cerebrais envolvidas na consolidação da memória no TRO, uma vez que a memória de reconhecimento visa identificar o armazenamento de estímulos previamente experimentados (BALDERAS et al., 2014).

Com intuito de prevenir os prejuízos ocasionados pela cocaína sobre a memória, nós avaliamos o teste de reconhecimento de objetos em animais previamente tratados com N-acetilcisteína (NAC) seguidos do tratamento com cocaína. Como já descrito o tratamento com NAC tem sido proposto como uma alternativa para a redução dos danos cognitivos ocasionados pelo consumo de cocaína

Cabe destacar que, o nosso estudo foi o primeiro a realizar o teste de reconhecimento de objetos em animais submetidos a administração de cocaína, porém previamente tratados com N-acetilcisteína. Optamos por utilizar a metodologia do TRO, visto que se ela destaca como um excelente teste comportamental, não depende de motivação externa, recompensa ou punição, além de necessitar de pouco treinamento ou habituação. Por estas razões tem sido muito utilizado para testar animais que recebem tratamentos que podem alterar o sistema de recompensa (SILVERS et al., 2007).

Nossos dados sugerem que os animais que receberam NAC previamente ao tratamento com cocaína (10mg/Kg), apresentaram melhores índices de reconhecimento do objeto no teste de memória de longo prazo, quando comparados aos animais tratados previamente com salina.

Como já descrito anteriormente, o consumo repetido de cocaína ocasiona um aumento no disparo dopaminérgico da área tegmental ventral (ATV) para o córtex pré-frontal (CPF), que como consequência acarreta na estimulação da neurotransmissão

glutamatérgica no córtex pré-frontal, que ao estimular a neurotransmissão GABAérgica, promove correntes pós-sinápticas inibitórias em neurônios piramidais pré-frontais, com consequente prejuízo nas respostas relacionadas à memória de reconhecimento (Figura 22A) (GOLDMAN-RAKIC et al., 2000; TZSCHENTKE e SCHMIDT, 2003).

Diante da interação entre a neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica, tem-se que uma possível explicação para o efeito protetor da NAC sobre a memória de reconhecimento de objetos pode decorrer da modulação indireta, por meio da cisteína, nos sistemas de neurotransmissão glutamatérgica. Assim a cistina, produto de oxidação da cisteína, pode ter participado da regulação dos níveis extracelulares de glutamato por intermédio do trocador presente nas células gliais - antitransportador cistina/glutamato. A NAC tem sido apontada como facilitadora desse antitransporte, e que por meio desse mecanismo pode regular os níveis de glutamato extracelular, sendo responsável por até 60% do glutamato extracelular (BAKER et al., 2003; ALBRECHT et al., 2010). O glutamato ao interagir com auto receptores glutamatérgicos, do tipo mGluR2/3, modula a neurotransmissão glutamatérgica no córtex pré-frontal (DEAN et al., 2011), podendo ser um dos mecanismos responsáveis pela preservação das respostas relacionadas à memória (Figura 22B).

Pesquisa realizada por Madayag e colaboradores evidenciou que o pré-tratamento com NAC preveniu a interferência da cocaína sobre o trocador de cistina/glutamato, e com isso as subseqüentes alterações nos níveis de glutamato extracelular no nucleus accumbens (MADAYAG et al., 2007). Com isso a NAC pode ter agido modulando os níveis de glutamato nas sinapses dos ratos tratados com cocaína.

Além disso, a participação da NAC sobre o antitransportador cistina/glutamato também tem sido apontada como o mecanismo responsável pelo aumento na síntese de glutathione reduzida (GSH), uma vez que a NAC permite um aumento no fornecimento do substrato – L-cisteína – para síntese de GSH (para revisão ver BERK et al., 2013).

Considerando, o exposto acima, nós também avaliamos o índice de GSH, em tecidos envolvidos com a memória, entretanto não detectamos aumento, pelo método utilizado, nos tecidos do CPF e HPC dos animais previamente tratados com NAC seguidos do tratamento com cocaína (10mg/Kg) e animais tratados com salina

seguidos do tratamento com cocaína (10mg/Kg).

Estudo realizado por Burgunder e colaboradores também mostrou que o aumento da disponibilidade de cisteína não acarreta necessariamente em aumento na síntese de GSH (BURGUNDER et al, 1989). Essa ausência de relação direta entre a síntese de GSH e a disponibilidade dos substratos pode decorrer da necessidade da ativação de um complexo enzimático necessário para a síntese (LU, 2013).

Outro possível envolvimento da NAC – L-cisteína - na proteção da memória de reconhecimento pode estar relacionado a detoxificação de espécies reativas de oxigênio e de radicais quinona e semiquinonas provenientes da autooxidação da dopamina, a qual tem disponibilidade sináptica aumentada em usuários de cocaína (SPENCER et al, 1998; para revisão ver BERK et al, 2013). Assim, a dopamina pode induzir estresse oxidativo em neurônios dopaminérgicos e adjacentes, o que pode contribuir para a neurotoxicidade devido ao seu efeito direto no aumento da concentração de dopamina sináptica (CUNHA-OLIVEIRA et al, 2014).

A dopamina sofre autooxidação no anel de catecol com formação de quinonas e semiquinonas, juntamente com o ânion superóxido ($O_2 \bullet^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além das espécies reativas de oxigênio as quinonas também são moléculas com deficiência de elétrons e, assim, reagem prontamente com nucleófilos, como grupos sulfidríla reduzidos de resíduos de cisteína, os quais são frequentemente localizados nos sítios funcionais de proteínas. Essa reação resulta em modificação covalente que leva à inativação da função da proteína, afetando a sobrevivência celular (HASTINGS, 1995).

Com base nos nossos dados, o índice de carbonilação de proteína no CPF e HPC dos animais tratados com cocaína na dose de (10mg/Kg) não diferiu significativamente dos animais do grupo controle. De forma interessante o pré-tratamento com NAC parece prevenir/reduzir o estresse oxidativo sobre as proteínas nos animais tratados com cocaína, embora não tenha sido significativo.

O possível mecanismo responsável pelo prejuízo da memória e pelo desencadeamento do estresse oxidativo, no presente trabalho, pode ter sido o aumento no disparo dopaminérgico, no córtex pré-frontal, decorrente do consumo de cocaína. E a ação da cisteína, proveniente da NAC pode ter desempenhado um papel preponderante sobre proteção de regiões cerebrais envolvidas na codificação da

memória de reconhecimento. Uma vez que, a cisteína da NAC pode ter sido utilizada como molécula alvo para a reação com os radicais livres provenientes da autooxidação da dopamina.

Os resultados obtidos neste trabalho trazem avanços no conhecimento do potencial efeito protetor da NAC na memória de reconhecimento de animais submetidos a tratamento subagudo com cocaína. Os dados produzidos podem auxiliar na compreensão de mecanismos moleculares envolvidas nas alterações cognitivas e de estresse oxidativo.

Ainda temos como meta futura, a identificação das proteínas que sofreram carbonilação em animais tratados, como também, sobre quais proteínas ocorreu o efeito antioxidante protetor da NAC, o que poderia identificar alvos moleculares para um possível tratamento de usuários de cocaína, visando a redução de danos cognitivos.

Nossos achados geraram dados que podem contribuir para estudos futuros, e colaborar com a possível prevenção dos danos cognitivos sobre a memória decorrentes do consumo de cocaína.

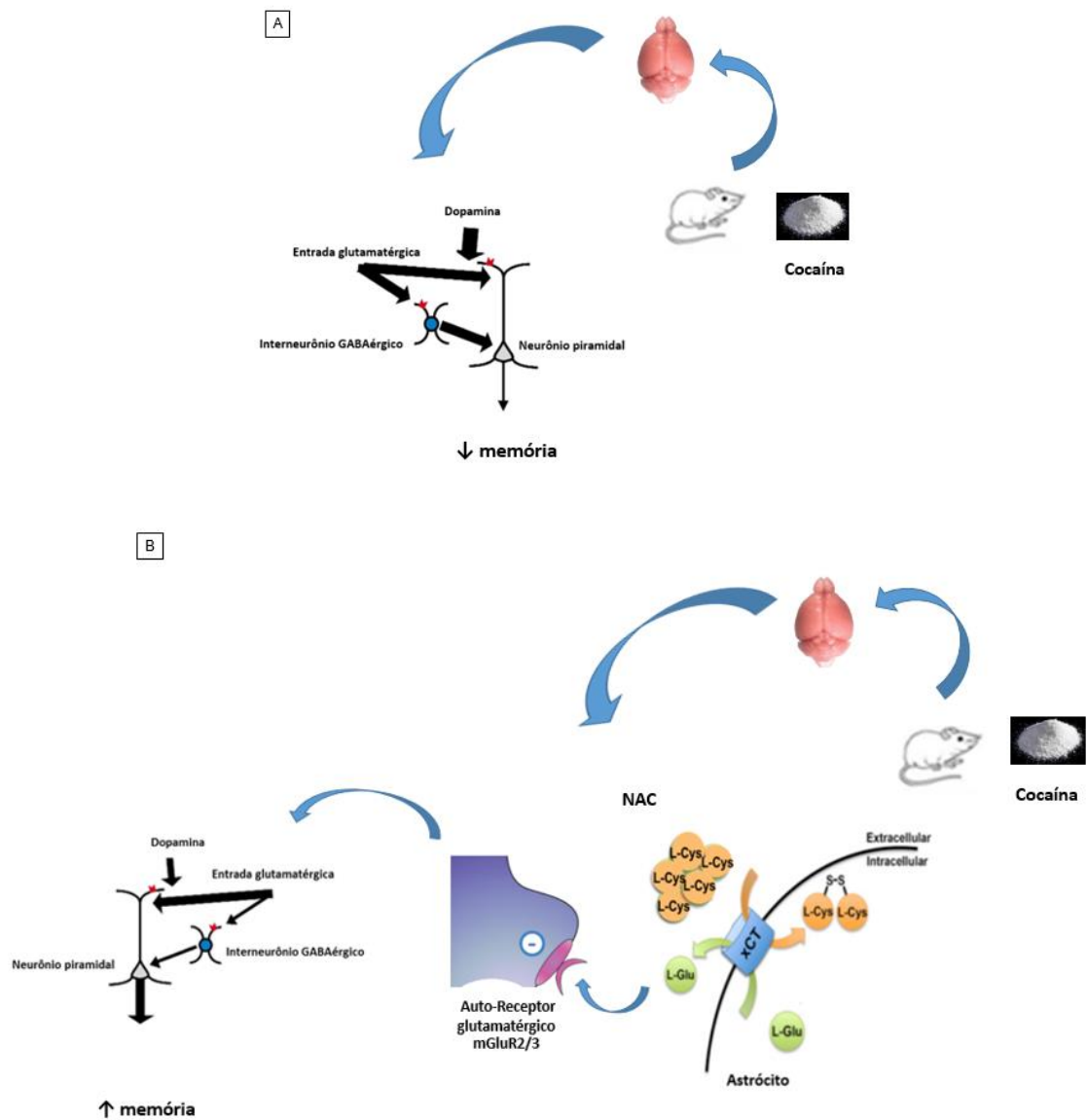


Figura 22. Representação esquemática simplificada dos mecanismos de ação da cocaína e da N-acetilcisteína sobre o circuito de memória do córtex pré-frontal. (A) Possível mecanismo responsável pelo prejuízo à memória relacionado ao consumo de cocaína. (B) Possível mecanismo desencadeado pelo pré-tratamento com NAC seguido do tratamento com cocaína. Extraído e modificado de (GOLDMAN-RAKIC et al., 2000; DEAN et al., 2011). xCT: antitransportador cistina/glutamato; receptor D1 em vermelho; NAC: N-acetilcisteína; L-Cys: Cisteína; L-Glu: Glutamato.

6. CONCLUSÃO

Os dados apresentados nesse estudo indicam que:

- ✓ A administração subaguda de cocaína na dose de 10 mg/kg prejudicou a memória de reconhecimento de curto prazo;
- ✓ A administração subaguda de cocaína nas doses de 5 e 10 mg/kg prejudicou a memória de reconhecimento de longo prazo;
- ✓ A administração prévia de N-acetilcisteína preveniu os efeitos de prejuízo na memória de reconhecimento de longo prazo causado pela administração subaguda de cocaína na dose de 10 mg/Kg;
- ✓ A administração da dose de cocaína de 10mg/Kg não ocasionou aumento no estresse oxidativo proteico no CPF e HPC.

Portanto, nossos dados demonstram um efeito protetor da N-acetilcisteína sobre os prejuízos cognitivos causados pela cocaína.

7. REFERÊNCIAS

- ACQUAS, E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Differential Effects of Caffeine on Dopamine and Acetylcholine Transmission in Brain Areas of Drug-naïve and Caffeine-pretreated Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 182–193, 2002.
- AGGLETON, J. P. One-trial object recognition by rats. **The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B**, v. 37, n. 4, p. 279–294, 1985.
- ANGELUCCI, M. E.; VITAL, M. A.; CESÁRIO, C.; et al. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **European journal of pharmacology**, v. 373, n. 2–3, p. 135–140, 1999.
- ALBRECHT, P.; LEWERENZ, J.; DITTMER, S.; et al. Mechanisms of Oxidative Glutamate Toxicity: The Glutamate/Cystine Antiporter System xc as a Neuroprotective Drug Target. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 373–382, 2010.
- ARUOMA, O. I. Free Radicals , Oxidative Stress , and Antioxidants in Human Health and Disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society** v. 75, n. 2, p. 199–212, 1998.
- BACONI, D. L. et al. Current Concepts on Drug Abuse and Dependence. **Journal of Mind and Medical Sciences** v. 2, n. 1, 2015.
- BAKER, D. A.; MCFARLAND, K.; LAKE, R. W.; et al. Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. **Nature Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 743–749, 2003.
- BALDERAS, I.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. J.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Model Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Behavioural Brain Research**, p. 1–10, 2014.
- BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assay for superoxide dismutase. *Methods of Biochemical Analysis*, v. 32, p 279-312, 1987.
- BARJA, G.; HERRERO, A. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 30, n. 3, p. 235–243, 1998.
- BARKER, G. R. I.; BIRD, F.; ALEXANDER, V.; WARBURTON, E. C. Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2948–2957, 2007.
- BERK, M. et al. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 167–177, 2013.
- BERNARDO, N. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; DE PAIVA, M. J. N.; MAIA, P. P. Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil. **International Journal of Drug Policy**, v. 14, n. 4, p. 331–334, 2003.
- BORTOLOTTI, F., GOTTARDO, R., PASCALI, J. AND TAGLIARO, F. Toxicokinetics

of Cocaine and Metabolites: The Forensic Toxicological Approach. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 5658-5663, 2012.

BOWERS, M. S. et al. N-acetylcysteine decreased nicotine reward-like properties and withdrawal in mice. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 6, p. 995–1003, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, v. 2, Brasília, 2010.

BRIGELIUS-FLOHE, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 99, p. 951–965, 1999.

BURGUNDER, J. M., VARIALLI, A., LAUTERBURG, B. H. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 36, p. 127-131, 1989.

CARROL, E. **Coca: the plant and its use**. NIDA. Monografia, p.35-46, 1977.

CAULI, O.; MORELLI, M. CaffVAeine and the dopaminergic system. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 2, p. 63–77, 2005.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527–605, 1979.

COTGREAVE, I. A. N-Acetylcysteine: Pharmacological Considerations and Experimental and Clinical Applications. **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 205–227, 1997.

CREGLER, L.L., MARK, H. Medical complications of cocaine abuse. v. 315, n. 23, p. 1495–1500, 1986.

CROPLEY, V. L.; FUJITA, M.; INNIS, R. B.; NATHAN, P. J. Molecular Imaging of the Dopaminergic System and its Association with Human Cognitive Function. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 10, p. 898–907, 2006.

CUNHA-OLIVEIRA, T.; REGO, A. C. AND OLIVEIRA, C. R. Cocaine as a Neurotoxin. **Handbook of Neurotoxicity**, p.278-297, 2014

DACKIS, C.A.; GOLD, M. S. New Concepts in Cocaine Addiction: The Dopamine Depletion Hypothesis. **Neuroscience & Biobehavioral Review**, v. 9, p. 469–477, 1985.

DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: Current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 78–86, 2011.

DEISSEROTH, A; DOUNCE, A L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological reviews**, v. 50, n. 3, p. 319–75, 1970.

DILEONE, R. J.; TAYLOR, J. R.; PICCIOTTO, M. R. Mechanisms of food reward and drug addiction. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 1330–1335, 2012.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 649–671, 2000.

DUALIBI, L.B.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. Profile of cocaine and crack users in Brazil Perfil dos usuários de cocaína e crack no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, p. 545–557, 2008.

EDUARDO, C.; TORCATO, M. O uso de drogas e a instauração do proibicionismo no Brasil The psychoactives use and the early prohibitionism in Brazil. **Saúde & Transformação Social**. p. 117–125, 2013.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1 nov. 1988.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p. 244–254, 2010.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.

EVERITT, B. J. Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories - indications for novel treatments of addiction. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 2163–2182, 2014.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872–879, 2002.

FERGUSON, B. R. . G. W. Development of thalamocortical connections between the mediodorsal thalamus and the prefrontal cortex and its implication in cognition. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, p. 1–10, 2015.

FLEMING, J.A.; BYCK, R.; BARASH, P.G. Pharmacology and therapeutic applications of cocaine. **Anesthesiology**, v.73, p. 518-531, 1990.

FLOHÉ, L.; GONZLER, W. A. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods In Enzymology*, v. 105, p.114-120, 1984.

FRIDOVICH, I. Superoxide Radical and. v. 64, n. III, p. 97–112, 1995.

GAWIN, F. H. Cocaine Addiction : Psychology and Neurophysiology. v. 251, n. 11, p. 1580–1586, 1991.

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; MULY, E.C.; WILLIAMS, G.V. D1 receptors in prefrontal cells and circuits. **Brain Research Reviews**, n, 31, p. 295–301, 2000.GOODMAN, J.; PACKARD, M. G. Memory Systems and the Addicted Brain. **Frontiers in Psychiatry**, v. 7, p. 1–9, 2016.

GORELICK, D. A.; GARDNER, E. L.; XI, Z. Agents in Development for the Management of Cocaine Abuse. **Drugs**, v. 64, n. 14, p. 1547–1573, 2004.

GORELICK, D. A. Cocaine use disorder in adults: Epidemiology, pharmacology, clinical manifestations, medical consequences, and diagnosis. **Literature review current through**, 2017.

GRABOWSKI, J.; DWORKIN, S. I. Cocaine : An Overview of Current Issues Cocaine :

An Overview of Current Issues. n. April, 1985.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry*, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980

HAASEN, C.; PRINZILEVE, M.; GOSSOP, M.; FISCHER, G.; CASA, M. Relationship between cocaine use and mental health problems in a sample. **World Psychiatry**, v. 4, n. 3, p. 173–176, 2005.

HABER, S. N.; KNUTSON, B. The Reward Circuit: Linking Primate Anatomy and Human Imaging. *Neuropsychopharmacology Reviews*, v.35, p. 4–26, 2010.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 715S–725S, 1993.

HASTINGS, T. G. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 2, p. 919–924, 1995.

HAWKS, P. Cocaine: The material. NIDA. Monografia, p. 47-61, 1977.

HEARD, K. J. Acetylcysteine for Acetaminophen Poisoning. p. 285–292, 2008.

HULBERT, A. J. et al. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1175–1213, 2007.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. **Nature Reviews**, v. 2, p. 695–703, 2001.

KANTAK, K. M.; UDO, T.; UGALDE, F.; LUZZO, C.; DI PIETRO, N.; EICHENBAUM H. B. Influence of cocaine self-administration on learning related to prefrontal cortex or hippocampus functioning in rats. **Psychopharmacology**, v. 181, p. 227–236, 2005

KELLY, G. S. Clinical Applications of N-acetylcysteine N-acetylcysteine. v. 3, n. 2, p. 114–127, 1998.

KESNER, R. E.; HUNT, M. E.; WILLIAMS, J. M.; LONG, J. M. Prefrontal Cortex and Working Memory, localização espacial, informação visual de objetos. **Cerebral cortex**, v. 6, p. 311–318, 1996.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of Addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217–238, 2010.

LARANJEIRA, R.; MADRUGA, C.S.; PINSKY, I.; CAETANO, R.; MITSUHIRO, S.S.; CASTELLO, G. II Levantamento Nacional de Álcool e Droga. 2012.

LIMA, M. N. M.; PRESTI-TORRES, J.; DORNELLES, A.; et al. Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, n. 3, p. 305–310, 2011.

LOSCHEN, G. et al. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. **FEBS Letters**, v. 42, n. 1, p. 68–72, 1974.

LUSHCHAK, V. Glutathione homeostasis and functions: Potential targets for medical interventions. **Journal of Amino Acids**, p 1-26, 2012.

MADAYAG, A.; LOBNER, D.; KAU, K. S.; et al. Repeated N-Acetylcysteine Administration Alters Plasticity-Dependent Effects of Cocaine. **The Journal of**

Neuroscience, v. 27, n. 51, p. 13968–13976, 2007.

MAJEWSKA, M. D. Cocaine addiction as a neurological disorder: implications for treatment. **NIDA research monograph**, v. 163, p. 1–26, jan. 1996.

MARKLUND, S. L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 24, p. 7634–8, 1982.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde. 1999.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595–603, 1999.

MELO, L. C. S. et al. Delta(9)-THC administered into the medial prefrontal cortex disrupts the spatial working memory. **Psychopharmacology**, v. 183, n. 1, p. 54–64, 15 nov. 2005.

MCCLURE, E. A.; GIPSON, C. D.; GRAY, K. M. Potential Role of N -Acetylcysteine in the Management of Substance Use Disorders. p. 95–106, 2014.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.

NAKAMURA, E. M. et al. Reversible effects of acute and long-term administration of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. **Drug and alcohol dependence**, v. 28, n. 2, p. 167–75, ago. 1991.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, p. 474–478, 1972.

NIIGAKI, S. T.; SILVA, R. H.; PATTI, C. L.; et al. Amnestic effect of cocaine after the termination of its stimulant action. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 1, p. 212–218, 2010.

PAN, H. T.; MENACHERRY, S.; JUSTICE, J. B. Differences in the Pharmacokinetics of Cocaine in Naive and Cocaine Experienced Rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 56, n. 4, p. 1299–1306, 1991.

PETERSEN, R.C. History of Cocaine. NIDA. Monografia, p. 17-32, 1977a.

PETERSEN, R.C. Cocaine: A overview. NIDA. Monografia, p. 5-16, 1977b.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

POMIERNY-CHAMIOŁO, L.; MONICZEWSK, A.; WYDRA, K.; SUDER, A.; FILIP, M. Oxidative Stress Biomarkers in Some Rat Brain Structures and Peripheral Organs Underwent Cocaine. **Neurotoxicity Research**, v. 23, p. 92–102, 2013.

POTVIN, S.; STAVRO, K.; RIZKALLAH, E.; PELLETIER, J. Cocaine and cognition: A systematic quantitative review. **Journal of Addiction Medicine**, v. 8, n. 5, p. 368–376, 2014.

QUIRK, P. L.; RICHARDS, R. W.; AVERY, D. D. Subchronic cocaine produces training

paradigm-dependent learning deficits in laboratory rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 68, n. 3, p. 545–553, 2001.

RAVINDRANATH, V., SHIVAKUMAR, B. R. AND ANANDATHEERTHAVARADA, H. K. Low glutathione levels in brain regions of aged rats. **Neuroscience Letters**, v.101, p.187-190, 1989.

RITZ, M.C.; LAMB, R.J.; GOLDBERG, S.G.; KUCHAR, M.J. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. **Report Science**, p. 1219-1223, 1987

ROBISON, A. J.; NESTLER, E. J. Mechanisms of addiction. v. 12, n. November, 2011.

ROTHBLAT, L. A.; KROMER, L. F. Object recognition memory in the rat: the role of the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 42, n. 1, p. 25–32, 1991.

RUBIN, R.D.; WATSON, P. D.; DUFF, M. C.; COHEN, N. J. The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, p. 1–15, 2014.

RUETSCH, Y. A.; BÖNI, T.; BORGEAT, A. From Cocaine to Ropivacaine : The History of Local Anesthetic Drugs. p. 175–182, 2001.

RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. 2013.

SAINT-DENIS, M. et al. Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, n. 4, p. 602–614, 1998.

SALMINEN, L. E.; PAUL, R. H. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: A theoretical review. **Reviews in the Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 805–819, 2014.

SERPER, M. R.; BERGMAN, A.; COPERSINO, M. L.; CHOU, J. C. Y.; RICHARME, D.; CANCRO, R. Learning and memory impairment in cocaine-dependent and comorbid schizophrenic patients. **Psychiatry Research**, v. 93, p. 21-32, 2000.

SIEGEL, R. K. **Cocaine: recreational use and intoxication**. NIDA. Monografia. p. 119-136, 1977.

SIEGEL, R. K. Cocaine smoking. p. 373, 1982.

SIES, B. H. Biochemistry of Oxidative Stress. v. 25, p. 1058–1071, 1986.

SILVERS, J. M.; HARROD, S. B.; MACTUTUS, C. F.; BOOZE, R. M. Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 166, n. 1, p. 99–103, 2007.

SCHWARTZ, B. G.; REZKALLA, S.; KLONER, R. A. Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine Cardiovascular Effects of Cocaine. p. 2558–2569, 2010.

SMILKSTEIN, M. J. et al. Efficacy of Oral N-Acetylcysteine in the treatment of Acetaminophen overdose. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 24, p. 1557–1562, 1988.

SNYDER, S. H.; KATIMS, J. J.; ANNAU, Z.; BRUNS, R. F.; DALY, J. W. Adenosine

receptors and behavioral actions of methylxanthines. **Neurobiology**, v. 78, n. 5, p. 3260–3264, 1981.

SPENCER, J. P. E., JENNER, P., DANIEL, S. E., LEES, A. J., MARSDEN, D. C., HALLIWELL, B. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. **Journal of Neurochemistry**, v.71, n.5, p. 2112-2122, 1998.

STANKOWSKI, J.N.; CODREANU, S.G., LIEBLER, D.C.; McLAUGHIN, B. Analysis of protein targets by oxidative stress using the biotin-avidin-capture methodology. **Cell Culture Techniques, Neuromethods**, v.56, 2011.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D. T.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue- substrate, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 1283–1297, 2009.

TAKAHASHI, R. N.; PAMPLONA, F. A.; DANIEL, R.; PREDIGER, S. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 4, p. 2614–2632, 2008.

TOCARTO, C. E. M. Saúde & Transformação Social O uso de drogas e a instauração do proibicionismo no Brasil The psychoactives use and the early prohibitionism in Brazil. **Saúde e Transformação Social**, p. 117–125, 2013

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. v. 2, p. 335–344, 2003.

TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. Glutamatergic mechanisms in addiction. **Molecular Psychiatry**, v. 8, p. 373–382, 2003.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report, 2017.

UYS, J. D.; KNACKSTEDT, L.; HURT, P.; TEW, K. D.; MANEVICH, Y.; HUTCHENS, S.; TOWNSEND, D. M.; KALIVAS, P. W. Cocaine-Induced Adaptations in Cellular Redox Balance Contributes to Enduring Behavioral Plasticity. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 2551–2560, 2011.

VASICA, G.; TENNANT, C. C. Cocaine use and cardiovascular complications. p. 260–262, 2002.

VAN GOETHEM, N. P.; RUTTEN, K.; VAN DER STAAY, F. J.; et al. Object recognition testing: Rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 2, p. 323–334, 2012.

VRIES, N. DE; FLORA, S. DE. N-Acetyl-Z-Cysteine. **Journal of cellular biochemistry**, v. 277, n. 1 993, p. 270–277, 1993.

WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 131–139, 2015.

WEBER, D.; DAVIES, M. J.; GRUNE, T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. **Redox Biology**, v. 5, p. 367–380, 2015.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.177, p. 325-332, 1981

WILLIAMS, G. V.; CASTNER, S. A. Under the curve: Critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. **Neuroscience**, v. 139, n. 1, p. 263–276, 2006.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological Review**, v. 94, n. 4, p. 469–492, 1987.

WITKO-SARSAT, V. DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products: novel uraemic toxins and pro-inflammatory mediators in chronic renal failure? **Journal of Immunology**, v. 161, n.5, p. 2524-2532, 2008.

WOLF, M. E. Synaptic mechanisms underlying persistent cocaine craving. **Nature Publishing Group**, v. 17, n. 6, p. 351–365, 2016.

WOODARD, G. Principles in drug administration. In: Gay WJ, editor. **Methods of animal experimentation**. Academic Press; New York: 1965. pp. 343–359, 1965.

ZHOU, F. M.; HABLITZ, J. J. Dopamine modulation of membrane and synaptic properties of interneurons in rat cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 81, n. 3, p. 967–976, 1999.

